

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Zentrum der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Gstöttner

**Zellzyklussynchronisation humaner Plattenepithelkarzinomzellen mit Serotonin und EGF**

–

**Versuch der Überführung inaktiver G0-Phase-Zellen in eine proliferative Phase des Zellzyklus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Christian Werner  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main  
2007



Dekan: Professor Dr. med. Josef M. Pfeilschifter

Referent: Professor Dr. med. Rainald Knecht

Koreferent: Professor Dr. phil. nat. Klaus Strebhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2008

meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (SCCHN)	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Einteilung nach der TNM-Klassifikation und histologischem Differenzierungsgrad (Grading)	1
1.1.3 Diagnose, Therapie und Nachsorge	2
1.1.4 Prognose der Kopf-Hals-Tumoren	4
1.2 Der Zellzyklus	8
1.2.1 Signaltransduktion	9
1.2.2 EGF-Rezeptor-Kaskade	9
1.3 Karzinogenese	11
1.4 Blockade der Zellaktivierung durch Chemotherapie	13
1.4.1 Allgemeine Grundlagen der chemotherapeutischen Therapie	13
1.4.2 Chemotherapie bei SCCHN	14
1.4.3 Chemotherapiesensibilität	15
1.5 Zielsetzung	16
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Material	17
2.1.1 Laborgeräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Primärantikörper	18
2.1.5 Sekundärantikörper	19
2.1.6 Chemotherapeutika und Reagenzien	19
2.1.7 Puffer	20
2.1.8 Sonstiges	21
2.1.9 Zelllinien	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Kultivierte Zelllinien	22
2.2.2 Anlage einer Zellkultur	22
2.2.3 Ablauf der Zellkultivierung	23

2.2.4	Ernten der Zellen mit Accutase™ .....	23
2.2.5	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS Analyse).....	24
2.2.6	Western Blot Analyse .....	26
2.2.6.1	Proteinextraktion.....	26
2.2.6.2	Proteinmessung.....	27
2.2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	28
2.2.6.4	Proteintransfer / Western Blot.....	29
2.2.6.5	Antikörperbeschichtung .....	30
2.2.7	Ki-67 Färbung.....	31
2.2.7.1	Probenvorbereitung .....	31
2.2.7.2	Färbung 32	
2.2.7.3	Zellzählung Ki-67-positiver Zellen.....	33
2.2.8	Kontrollgruppen .....	33
2.3	Statistik.....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Stimulation von Detroit-562 .....	35
3.1.1	Stimulation der Zellen mit EGF, Serotonin, Interleukin-6 und GCSF unterschiedlicher Konzentration.....	35
3.1.1.1	Stimulation mit EGF.....	35
3.1.1.2	Stimulation mit Serotonin.....	36
3.1.1.3	Stimulation mit Interleukin-6.....	37
3.1.1.4	Stimulation mit GCSF .....	38
3.1.2	Stimulation von Detroit-562 mit Kombinationen der Wachstumsfaktoren .....	39
3.1.2.1	Stimulation mit IL-6 kombiniert mit Serotonin, EGF oder GCSF .....	39
3.1.2.2	Stimulation mit Serotonin kombiniert mit EGF und GCSF.....	42
3.1.2.3	Stimulation mit EGF kombiniert mit GCSF.....	44
3.2	Stimulation der Zelllinien und chemotherapeutische Intervention.....	46
3.2.1	Chemotherapie mit Mab425 und ZD1839.....	46
3.2.1.1	Zellzählung bei mit Mab425 behandelten Zellen.....	47
3.2.1.2	Western Blot bei mit Mab425 behandelten Zellen .....	49
3.2.1.3	Zellzählung bei mit ZD1839 behandelten Zellen.....	51
3.2.1.4	Western Blot bei mit ZD1839 behandelten Zellen.....	53
3.2.2	Chemotherapie mit Docetaxel .....	55
3.2.2.1	Zellzählung bei mit Docetaxel behandelten Zellen.....	55

3.2.2.2 Western Blot bei mit Docetaxel behandelten Zellen .....	57
3.2.3 Chemotherapie mit Cisplatin.....	59
3.2.3.1 Zellzählung bei mit Cisplatin behandelten Zellen.....	59
3.2.3.2 Western Blot bei mit Cisplatin behandelten Zellen.....	61
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1.1 Chemotherapeutische Intervention bei SCCHN.....	63
4.1.2 Sensibilisierung durch Wachstumsfaktoren .....	64
4.1.3 Ausblick .....	66
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>70</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>77</b>
<b>9 Lebenslauf.....</b>	<b>79</b>
<b>10 Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>81</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Levelteilung am Hals der AAO-HNS (Robbins, Clayman et al. 2002) ...	6
Abbildung 2	detaillierte Übersichtsdarstellung der EGF-Rezeptor-Kaskade, aus: <a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a> (Qian, Vass et al. 1998), (Wells 1999).....	10
Abbildung 3	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei einer Stimulation durch EGF in unterschiedlicher Konzentration.....	36
Abbildung 4	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit Serotonin in unterschiedlicher Konzentration.....	37
Abbildung 5	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit IL-6 in unterschiedlicher Konzentration.....	38
Abbildung 6	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit GCSF in unterschiedlicher Konzentration.....	39
Abbildung 7	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen bei Detroit-562 bei Stimulation mit IL-6 in Kombination mit Serotonin in unterschiedlicher Konzentration.....	40
Abbildung 8	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit IL-6 in Kombination mit EGF in unterschiedlicher Konzentration.....	41
Abbildung 9	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit IL-6 in Kombination mit GCSF in unterschiedlicher Konzentration.....	42
Abbildung 10	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit Serotonin in Kombination mit EGF in unterschiedlicher Konzentration.....	43



Abbildung 11	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit Serotonin in Kombination mit GCSF in unterschiedlicher Konzentration.....	44
Abbildung 12	FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen bei Detroit-562 durch eine Stimulation mit EGF in Kombination mit GCSF als Wachstumsfaktoren in unterschiedlicher Konzentration.....	45
Abbildung 13	Anzahl inaktiver Zellen im Mittel der Zelllinien Detroit-562, A431 und UMSCC-10B, mit und ohne Vorstimulation durch Serotonin und EGF und unter alleiniger chemotherapeutischer Intervention mittels Mab425 .....	48
Abbildung 14	A431: Darstellung des Aktivitätsgrades der MAPK in Kontrolle, Vorstimulation plus Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie mit Mab425.....	50
Abbildung 15	Anzahl inaktiver Zellen im Mittel der Zelllinien Detroit-562, A431 und UMSCC-10B, mit und ohne Vorstimulation durch Serotonin und EGF und unter alleiniger chemotherapeutischer Intervention mittels ZD1839 .....	52
Abbildung 16	A431: Darstellung der Aktivität der pMAPK in Kontrolle, Vorstimulation plus Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie mit ZD1839.....	54
Abbildung 17	Darstellung aller untersuchter Zelllinien (Detroit-562, A431 und UMSCC-10B) und deren totaler Zellanzahl in der Kontrollgruppe, der Gruppe, die eine Vorstimulation mit Serotonin und EGF vor einer chemotherapeutischen Intervention mit Docetaxel erhielt, der Gruppe, die eine Monotherapie mit Docetaxel erhielt und der Gruppe, die nur mit Serotonin und EGF vorstimuliert wurde .....	56
Abbildung 18	UMSCC-10B: Darstellung der Aktivität der pMAPK in Kontrolle, Vorstimulation plus Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie mit Docetaxel.....	58

Abbildung 19	Darstellung aller untersuchter Zelllinien (Detroit-562, A431 und UMSCC-10B) und deren totaler Zellanzahl in der Kontrollgruppe, der Gruppe, die eine Vorstimulation mit Serotonin und EGF vor einer chemotherapeutischen Intervention mit Cisplatin erhielt, der Gruppe, die eine Monotherapie mit Cisplatin erhielt und der Gruppe, die nur mit Serotonin und EGF vorstimuliert wurde .....	60
Abbildung 20	UMSCC-10B: Darstellung der Aktivität der pSTAT-3 in Kontrolle, Vorstimulation plus Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie mit Cisplatin .....	62

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Einteilung der Schweregrade über die TNM-Klassifikation nach UICC.....	2
-----------	--	---

# 1 Einleitung

## 1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (SCCHN)

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Jedes Jahr erkranken ungefähr 350000 Menschen in Deutschland an malignen Erkrankungen (Lang, Wollenberg et al. 2002). In den westlichen Industrienationen sind dies im Kopf-Hals-Bereich immerhin ungefähr 80000 Neuerkrankungen pro Jahr. Damit rangieren Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (SCCHN) in einer weltweiten Tumorstatistik auf Platz 6 (Vokes, Weichselbaum et al. 1993), (Parker, Tong et al. 1996) (Jemal, Siegel et al. 2006).

Als besondere Risikofaktoren für das Auftreten von SCCHN gelten Tabakkonsum und exzessiver Alkoholgenuss. Des Weiteren werden noch andere Faktoren diskutiert, unter anderem das gehäufte Auftreten von Infektionen mit dem humanen Papillomavirus bei Patienten mit SCCHN (De Vita V. T. 2001).

Aus dem zunehmenden Gebrauch dieser Noxen resultierte, dass SCCHN seit den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts vermehrt aufgetreten sind. Besonders der geschlechtsspezifische Umgang mit diesen Noxen führt dazu, dass mehr Männer an Malignomen im Kopf-Hals-Bereich erkranken als Frauen (Verhältnis 4:1). Doch der Frauenanteil ist in den letzten Jahren beständig gestiegen.

### 1.1.2 Einteilung nach der TNM-Klassifikation und histologischem Differenzierungsgrad (Grading)

Die Unterscheidung der Karzinome im Kopf- und Hals-Bereich wird aufgrund der Lokalisation des Primärtumors getroffen. Man unterteilt die Karzinome dabei in Malignome der Lippe, der Mundhöhle und des Rachens (Oro-, Hypo- und Nasopharynx), des Larynx (Supraglottis, Glottis und Subglottis) und der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen.

Die international anerkannte TNM-Klassifikation der UICC beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors nach seiner Größe (zunehmend von T1 bis T4), den lympho-nodalen Befall (N0 bis N3) und die Fernmetastasierung (M0 oder M1). Die TNM-Klassifikation erfolgt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und stellt

das Ausmaß des Tumors zu diesem Zeitpunkt dar.

Nach histopathologischen Gesichtspunkten wird ein Tumor noch in 4 Schweregrade eingeteilt (G1 bis G4). Wobei G1 als ein hoher Differenzierungsgrad angesehen werden kann und bei G4 keine erkennbare Differenzierung vorhanden ist. Entdifferenzierte Tumoren wachsen in der Regel schneller, sind aber auch empfindlicher gegenüber einer Strahlentherapie und/oder einer Chemotherapie (Riede U.-N. 1998).

Zur Vereinfachung hat die UICC eine Stadieneinteilung herausgegeben, die die TNM-Klassifikation berücksichtigt, aber übersichtlicher erscheint.

**Tabelle 1 Einteilung der Schweregrade über die TNM-Klassifikation nach UICC**

UICC	Tumorstadien	Tumorprogression
<b>I</b>	T1 N0 M0	frühes Tumorstadium
<b>II</b>	T2 N0 M0	frühes Tumorstadium
<b>III</b>	T3 N0 M0 oder T1-3 N1 M0	fortgeschrittenes Tumor- stadium
<b>IV</b>	T4 oder N1-3 oder M1	fortgeschrittenes Tumor- stadium

### 1.1.3 Diagnose, Therapie und Nachsorge

Bereits durch anamnestisch erhobene Leitsymptome kann der Verdacht auf ein malignes Geschehen im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes geäußert werden. In fortgeschrittenen Stadien des Tumorwachstums treten Symptome wie Schluckbeschwerden oder Heiserkeit (beim glottischen Larynxkarzinom) in den Vordergrund. Die Diagnostik beginnt mit einer Inspektion, da viele der Tumoren im Kopf-Hals-Bereich aufgrund ihrer Lage inspektorisch gut erreichbar sind. Meist schließt sich daran eine Biopsie an, um histologisch eine Differenzierung und Beurteilung vornehmen zu können. Des Weiteren werden Sonographie, Computer- und Kernspintomographie zur genaueren Diagnosestellung eingesetzt.

In der Regel therapiert man Malignome des Kopf-Hals-Bereiches operativ, das heißt je nach Ausdehnung des Tumors wird auch sehr großzügig operiert. Angestrebt ist eine R0-Resektion, die mit einer vollständigen Tumorresektion im Gesunden gleichzusetzen ist. Sofern eine Metastasierung in die Lymphknoten bereits stattgefunden hat, reseziert man auch die davon betroffenen Bereiche in Form von einer partiellen oder radikalen Neck dissection.

An die operative Therapie, besonders bei vorheriger Metastasierung, schließt sich meist eine Strahlentherapie, eine Chemotherapie oder aber eine kombinierte Radio-Chemotherapie an. In manchen Fällen, so zum Beispiel beim Hypopharynxkarzinom wird die Strahlentherapie auch präoperativ eingesetzt, um den Tumor zu verkleinern. Die Auswahl und die Frage, ob es überhaupt sinnvoll ist, dass eine solche Therapieform angewandt wird, hängt vom jeweiligen Karzinomtyp ab.

Chemotherapie alleine wird oft nur zu palliativen Zwecken, bei fortgeschrittenen, nicht mehr operablen oder der Strahlentherapie unzugänglichen Tumoren eingesetzt. In der Regel werden Cisplatin, Carboplatin oder 5-Fluorouracil-Präparate eingesetzt, mit denen man teilweise Erfolge hatte. Die Ansprechrate liegt bei ca. 20%. Neuere Chemotherapeutika, wie die Taxane, die aus Eibenextrakt gewonnen werden, versprechen viel. Doch ihr Einsatz in der Therapie der SCCHN befindet sich zurzeit noch in der klinischen Erprobung. Gute Erfolge hat man dagegen bei ihrem Einsatz in der Therapie von Mammakarzinomen erzielen können (Hortobagyi 1999) (Hudis 1999) (Luck, Thomssen et al. 1997).

Nachsorgeuntersuchungen im Anschluss an eine erfolgte Therapie, mit nach Möglichkeit erfolgreicher Komplettresektion des Tumors und infiltrierter Strukturen, erfolgen in regelmäßigen, teils kurzfristigen Abständen. Wichtige diagnostische Vorgehensweisen sind die Endoskopie und zur Komplettierung, bildgebende Verfahren, wie die Computer- und Kernspintomographie. Außerdem kommen noch serologische Untersuchungen von Tumormarkern in Betracht. Diese Tumormarker bei SCCHN geben aber aufgrund ihrer wenig ausreichenden Sensitivität und Spezifität lediglich Hinweise auf eine klinisch und makroskopisch noch nicht fassbare Tumorprogression. Aber als beweisend können sie nicht angesehen werden. Ziel der Tumornachsorge ist es, das Auftreten von Rezidiven zu vermeiden und diese möglichst früh zu erkennen, da

die Therapiemöglichkeiten auf kleine, noch nicht in Nachbarstrukturen infiltrierte Rezidive beschränkt sind. Bei größeren, disseminiert wachsenden Rezidivtumoren, beziehungsweise –metastasen ist die Therapie eher palliativ. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Lebensqualität des Patienten, die bei inkurablen Tumoren besonders im Vordergrund stehen sollte. In diesen Bereich fällt auch die palliative Gabe von Schmerzmitteln, die in der Onkologie bei Bedarf nach einem festen Zeitplan erfolgt. Es werden peripher und zentral wirksame opiatfreie, aber auch opiathaltige Analgetika oral oder parenteral verabreicht.

#### **1.1.4 Prognose der Kopf-Hals-Tumoren**

Trotz der Beobachtung, dass schon meist kleinere Raumforderungen im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes zu Symptomen wie einem Fremdkörpergefühl und bald zu Beeinträchtigungen des Schluckaktes führen können, besteht bei einer Vielzahl von Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon ein fortgeschrittenes Tumorstadium. So ist schon bei ungefähr zwei Drittel der Patienten mit der Erstdiagnose eines SCCHN mit einer Metastasierung in die Halslymphknoten zu rechnen (Remmert, Rottmann et al. 2001). Im Vergleich zu anderen soliden Tumoren sind lokoregionäre Rezidive sehr häufig. Trotz erfolgter Therapie kommt es bei ungefähr 50 % der Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium zu Rezidiven und/oder Fernmetastasen, die die Prognose der SCCHN deshalb ungünstig machen (Lang, Wollenberg et al. 2002). Dies liegt unter anderem daran, dass durch den Abusus der verschiedenen Noxen, wie Tabakrauch und Alkohol, die Sensibilität der Schleimhäute derart herabgesetzt ist, dass frühzeitige Veränderungen im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes nicht wahrgenommen werden. Die eigene körperliche Wahrnehmung der Patienten in diesem Bereich ist oft durch Indolenz geprägt. Dies führt dazu, dass nicht unmittelbar ersichtliche tumoröse Veränderungen erst dann von den betroffenen Patienten bewusst wahrgenommen werden, wenn sie zu einer funktionellen Einschränkung führen, wie zum Beispiel Schluckstörungen, Verlegung der Atemwege und daraus resultierender Dyspnoe, Heiserkeit bei Larynxinfiltration oder dass die Tumordinfiltration eine zunehmende Schmerzsymptomatik hervorruft. Im Einzelfall hängt die Prognose von verschiedenen Faktoren und deren Zusammentreffen ab:

- anatomische Lokalisation des Tumors
- Tumorstadium insbesondere hinsichtlich Lymphknotenstatus
- histopathologischer Differenzierungsgrad
- Residualtumor nach erfolgter Therapie (R-Faktor)
- durch den Patienten beeinflussbare Faktoren

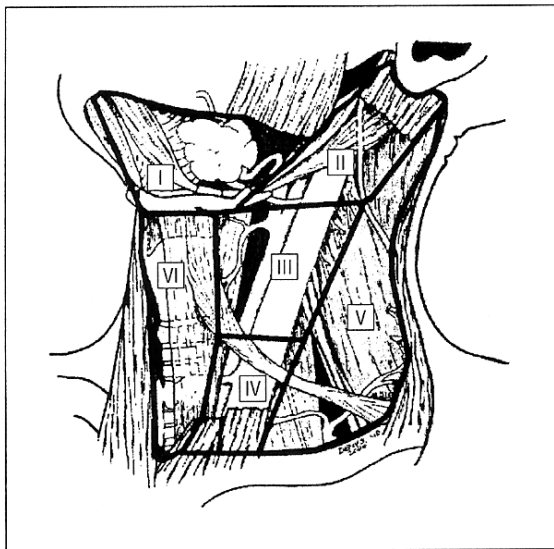
Stimm lippenkarzinome oder auch glottische Karzinome besitzen unter den Larynxkarzinomen noch die beste Prognose, ihre 5-Jahres-Überlebensrate wird mit circa 60% angegeben (Lang, Wollenberg et al. 2002), (Hussey, Latourette et al. 1991). Dies liegt daran, dass sie sich frühzeitig symptomatisch bemerkbar machen. Schon kleine Tumore im T1-Stadium verursachen häufig eine funktionell wirksame Stimmbandläsion, mit persistierender Heiserkeit, die den Patienten zu einer Abklärung motivieren. Oft kann dadurch ein Tumor in seinen frühen Stadien diagnostiziert werden. Durch die enge nachbarschaftliche Beziehung zum Schildknorpel gibt es eine anatomische Barriere, die den Tumor an seiner Ausbreitung hindern kann, zum anderen ist der Lymphabfluss spärlich und dadurch auch die Metastasierungstendenz des Tumors.

Wesentlich schlechter stellt sich die Situation bei supraglottischen Larynxkarzinomen dar. Hier ist, ähnlich wie bei den im Pharynx lokalisierten Tumoren, der Lymphabfluss stark ausgeprägt und eine funktionelle Läsion nicht so frühzeitig bemerkbar, wie bei glottischen Tumoren. Den Patienten fällt eine körperliche Veränderung oft in Form einer Schwellung am Hals auf, die durch die starke Metastasierungstendenz der Tumoren hervorgerufen wird, sodass der Tumor an sich erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden kann. So weisen bereits circa 80% der Hypopharynxkarzinome bei Diagnosestellung Halslymphknotenmetastasen auf. Außerdem werden Hypopharynxkarzinome erst relativ spät funktionell symptomatisch, ihre Erkennung bedarf einer sehr sorgfältigen fachspezifischen Untersuchung, die sehr häufig durch starke Abwehrreflexe der Patienten erschwert wird und deshalb in Form einer fiberendoskopischen Betrachtung des Geschehens in Lokalanästhesie oder einer in Narkose durchgeführten Panendoskopie durchgeführt werden muss. Diese Zusammenhänge erklären die schlechte 5-Jahre-Überlebensrate von unter 30%. (Lang, Wollenberg et al. 2002), (Grau, Cuchi et al. 1997), (Hussey, Latourette et al. 1991)



Dem Lymphknotenstatus kommt eine außerordentlich gewichtige Rolle bei der Beurteilung der Prognose zu. Mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen sinkt die 5-Jahre-Überlebenschance der betroffenen Patienten zum Teil sehr drastisch. So liegt diese beispielsweise, wenn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch keine Lymphknoten (N0-Stadium) befallen sind, bei circa 80%. Sie sinkt auf unter 50% wenn der Lymphknotenstatus als positiv beurteilt wird (N+).

Um eine sorgfältige Beurteilung der Prognose treffen zu können, ist das Ausmaß der regionären Lymphknotenmetastasierung von entscheidender Bedeutung. Wichtig sind dabei die Beurteilung des kapselüberschreitenden Wachstums, der Anzahl der betroffenen Lymphknoten und deren Lage (Levelteilung der AAO-HNS) (Houck and Medina 1995), (Leemans, Tiwari et al. 1993).



**Abbildung 1** Levelteilung am Hals der AAO-HNS (Robbins, Clayman et al. 2002)

Das Risiko Lymphknotenmetastasen nachweisen zu können, steigt mit zunehmender Größe des Primärtumors, sowie mit der Abnahme des histopathologischen Differenzierungsgrades. (Remmert, Rottmann et al. 2001). Das bedeutet, die Prognose geheilt zu werden und eine gute 5-Jahres-Überlebensrate zu haben, ist umso niedriger je fortgeschrittener der Tumor ist. Außerdem bringt die zunehmende Größe des Tumors ein weiteres Problem mit sich, nämlich das der chirurgischen Resektabilität im Gesunden. Maßgebliches Ziel der Resektion ist die Resektion im Gesunden (R0-Resektion), die jedoch bei ausgeprägten Primärtumoren mit großen Lymphknotenmetastasen durch Einbezug essentieller anatomischer Strukturen limitiert sein kann. Außerdem ist das Ausmaß der ästhetischen und der funktionellen Einbußen ein wich-

tiger Aspekt, der in die präoperative Planung mit einbezogen werden muss. Dabei eröffnet die R0-Resektion dem Patienten noch die größten Chancen auf ein rezidivfreies Überleben.

Meist nehmen Rezidive ihren Ursprung aus den Randbereichen des ehemaligen Primärtumors (Remmert, Rottmann et al. 2001). Deshalb ist die Prognose entsprechend schlecht, wenn nach Therapie (chirurgisch und/oder chemotherapeutisch) mikroskopisch noch aktive, lebende Tumorzellen nachweisbar sind oder sogar noch makroskopisch ein Resttumor erkennbar ist (R1- beziehungsweise R2-Resektion).

Die Diagnose eines fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomes (UICC III und IV) überleben unter der aktuellen Standardtherapie nur circa 30% der Patienten zwei Jahre oder länger (Vokes, Weichselbaum et al. 1993), bei circa 50% der Patienten kommt es zu regionalen Rezidiven. Ein weiteres Problem ist das Auftreten von Zweitkarzinomen im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes, die aufgrund einer Feldkanzerisierung entstehen. Dies ist bei circa 15% bis 30% der Patienten der Fall. Drittkarzinome können in circa 1% der Fälle erwartet werden (Dhooge and Albers 1994), (Grau, Cuchi et al. 1997). Außerdem können in circa 5% der Fälle zum Zeitpunkt der Erstdiagnose klinisch Fernmetastasen nachgewiesen werden.

## 1.2 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus kann in vier Phasen eingeteilt werden, die im Folgenden besprochen werden.

Direkt im Anschluss an eine Mitose tritt die proliferierende Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus ein (G = engl. gap: Lücke), hier wächst die diploide Zelle und synthetisiert zelluläre Proteine, Membranlipide und andere für den Fortbestand der Zelle nötige Bausteine. Fehlen in diesem Stadium der Zellteilung Wachstumsfaktoren oder besteht ein Substratmangel, so kann die Zelle in die G0-Phase des Zyklus eintreten, einen Ruhezustand, der unter Umständen lebenslang bestehen kann.

Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren durchläuft die Zelle in der G1-Phase weitere Differenzierungsprozesse, die bis zum Erreichen des so genannten Restriktionspunktes von den Wachstumsfaktoren abhängig sind. Ab hier ist ein Übertreten in die G0-Phase oder ein Verharren in der G1-Phase nicht mehr möglich. Im Anschluss an die G1-Phase tritt die Zelle in die S-Phase über, in der die DNS für die Teilung repliziert wird. Daran schließt sich die G2-Phase an, die sehr kurz sein kann und die Zelle auf eine neue Mitose vorbereitet.

Diese komplizierten Schritte der Zellteilung werden sehr genau durch zyklusabhängige Proteinkinasen reguliert, die an bestimmten Stellen des Zellzyklus enzymatisch aktiv sind und somit den Übergang in die nächste Phase steuern.

Neben diesen intrazellulären Regulationsmechanismen spielen extrazelluläre Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Teilungsvorganges. Zum einen die Kompetenzfaktoren, die für den Übergang von der G0- in die G1-Phase verantwortlich sind, Beispiele sind EGF und TGF- $\alpha$ , zum anderen Progressionsfaktoren, diese bedingen das Überschreiten des Restriktionspunktes und somit den wachstumsfaktorunabhängigen Teil der Zellteilung, Beispiele sind IGF-1 oder Insulin in hoher Dosierung. Daneben gibt es noch Antagonisten dieser „promoting factors“, wie zum Beispiel TGF- $\beta$ , Interferone und TNF- $\alpha$ . Alle diese Faktoren sind im weiteren Sinne Zytokine, die auf der Zelloberfläche als Liganden an spezifische Membranproteine binden, die wiederum eine Tyrosinkinaseaktivität besitzen und darüber eine Signaltransduktionskaskade intrazellulär steuern, deren Endpunkt die Aktivierung proliferatorischer Gene im Zellkern darstellt (Löffler G. 1998).

### 1.2.1 Signaltransduktion

Bestandteile der Signaltransduktionskaskade sind:

- membranassoziierte Rezeptoren
- Protein-Tyrosinkinase
- Protein-Serin- / Threoninkinase
- Proteinphosphatasen (wirken antagonistisch zu den Proteinkinasen)
- kleine G-Proteine
- GDP / GTP- Austausch oder freisetzende Faktoren
- Transkriptionsfaktoren

Die Rezeptoren sind in der Regel Monomere, die durch eine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle, eine transmembranöse Domäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinase gekennzeichnet sind. Sie dimerisieren bei Bindung eines Liganden. Dies hat eine Konformationsänderung zur Folge, die eine Tyrosinkinaseaktivität bedingt, die zur Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinreste führt.

Diese phosphorylierten Tyrosinreste sind die spezifischen Bindestellen, auch Src-homologe Domänen 2 (SH2-Domänen) genannt, für Signalproteine wie Grb2 oder GAP, die dort aktiviert werden.

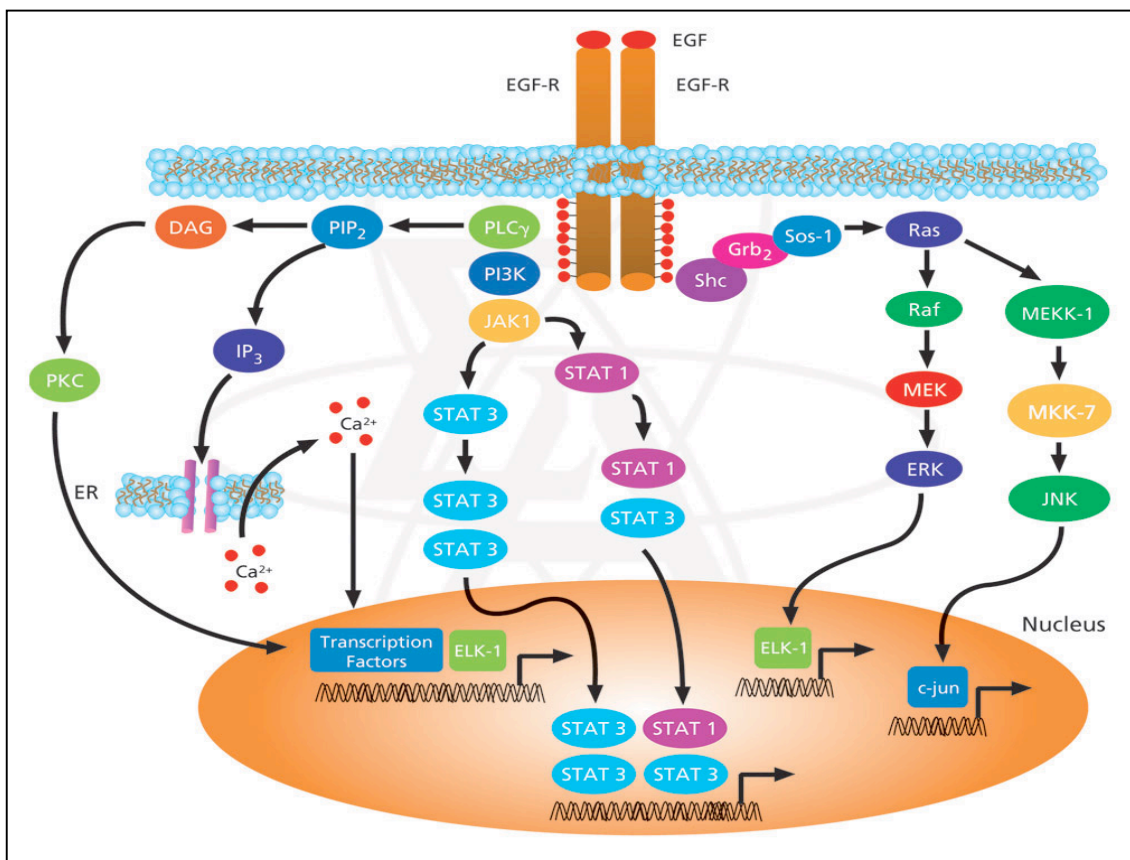
### 1.2.2 EGF-Rezeptor-Kaskade

Diese sehr komplexen Vorgänge sollen etwas deutlicher an der EGF-Rezeptor-Kaskade beschrieben werden, da diese in unseren Überlegungen eine wesentliche Rolle gespielt hat.

Bei der Aktivierung des Zellzyklus bindet extrazellulär ein Ligand, zum Beispiel EGF oder TNF- $\alpha$  an den EGFR (EGF-Rezeptor) und löst so dessen Dimerisierung aus. Intrazellulär bindet dann das Grb2-Protein an die SH2-Domäne des EGF-Rezeptors und wirkt so als Verknüpfung (Linker) zum Sos1-Protein. Diese beiden entsprechen als Grb2/Sos1-Komplex einem GDP/GTP Austauschfaktor. Dadurch wird GDP aus einem GDP-Ras-Komplex freigesetzt, so dass eine Assoziation von GTP und Ras möglich wird, die an Raf bindet und dieses aktiviert, indem es die Zellmembran kontaktiert, wo Raf dann durch eine Proteinkinase phosphoryliert wird. Dies ist der erste

Schritt einer ganzen Kaskade von Serin-/Threoninkinasen, die als MAP-Kinase-Kaskade (MAP, engl. = mitosis activator proteins) bezeichnet wird und schließlich dazu führt, dass Transkriptionsfaktoren, wie Elk1 und STAT-Proteine im Zellkern zu einer Modulation der Genexpression führen.

Die Aktivierung der STAT-Proteine erfolgt über zweierlei Mechanismen. Einmal durch die Phosphorylierung von STAT durch Jak-Kinasen und zum anderen direkt durch MAP-Kinasen. Diese aktivierten STAT-Proteine binden an INF-Rezeptoren und wandern dann in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren die Genexpression modulieren (Löffler G. 1998).



**Abbildung 2** detaillierte Übersichtsdarstellung der EGF-Rezeptor-Kaskade, aus: <http://www.sigmaaldrich.com> (Qian, Vass et al. 1998), (Wells 1999)

Genmutationen in Bereichen, die für Wachstumsfaktoren oder Glieder der Signaltransduktionskaskade kodieren, führen eventuell zu einem Kontrollverlust der Wachstumsfunktion und begünstigen damit die tumoröse Entartung.

### 1.3 Karzinogenese

In Krebszellen herrscht ein verändertes Wachstumsverhalten und Teilungsvermögen vor, das durch verschiedenartige Einflüsse hervorgerufen werden kann. Zum einen können bei der Tumorentstehung veränderte genetische Merkmale eine Rolle spielen, die familiär auftreten können, dies ist zum Beispiel bei der familiären Adenomatosis polyposi der Fall, in Form einer Mutation des APC-Genes. Zum anderen spielen exogene Einflüsse physikalischer oder chemischer Natur eine Rolle, die bei langandauernder Exposition zu Mutationen der genetischen Informationen führen können, die für die Zellproliferation und Teilung verantwortlich sind. Auch das Vorkommen bestimmter Viruserkrankungen kann zum Entstehen von entarteten Zellen führen.

Im Fall der Plattenepithelkarzinome im Hals-Rachen-Bereich ist unumstritten, dass bestimmte Noxen, wie chronischer Tabak- und Alkoholkonsum wesentliche Faktoren sind, die eine Tumorentstehung begünstigen. Außerdem wird über das Vorhandensein bestimmter Viren, wie EBV und humaner Papillomaviren bei der Tumorentstehung von Plattenepithelkarzinomen im oberen Aerodigestivtrakt diskutiert (Sisk, Bradford et al. 2003), (De Vita V. T. 2001).

Wenn es zu einer tumorösen Entartung einer Zelle durch oben genannte Noxen und/oder provozierende Faktoren gekommen ist, läuft das „Programm“ der Entartung sehr häufig ähnlich ab.

Die betroffene Zelle isoliert sich vom restlichen Zellverband und es kommt zu einem unkontrollierten, ausufernden Gewebewachstum einer Körperzelle (Monoklonalität). Durch genetische Defekte im zellulären Absterbeprogramm, der Apoptose oder dem Ausschalten bestimmter, den Tumor supprimierende Gene, kommt es zu einer ungebremsten Zellteilung. Normalerweise ist die Proliferation einer Zelle durch verschiedenartige Mechanismen reguliert, wie zum Beispiel durch eine vorhandene Zellkommunikation, durch das Expressieren proliferationshemmender Genprodukte (Tumorsuppressorgene, Onkogene, Hauptkontrollgene).

Außerdem spielt eine gesteigerte Sezernierung von Wachstumsfaktoren (Growth factor = GF) eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. Man hat festgestellt, dass in vielen Tumorgeweben eine Überexprimierung von GF-Genen vorhanden ist und dies eine übermäßige Sezernierung der Genprodukte zur Folge hat, deren Wirkung dazu führt, dass es zu einem vermehrten Abbruch der Zell-Zell-Kommunikation, einer ge-

steigerten Zellmotilität und einer Gewebeinvasion kommt. Außerdem führt ein proliferatives Dauersignal aufgrund einer qualitativ und quantitativ erhöhten Wachstumsrezeptordichte zu einem unkontrollierten und gesteigerten Zellumsatz. Beispiel hierfür ist das Protoonkogen c-erbB-2, dessen Genprodukt der EGF-Rezeptor ist. (Riede U.-N. 1998)

Ein weiterer Punkt, dem besonderes Augenmerk in der Entstehung von SCCHN geschenkt wird, ist die Überexpression von EGFR und seinem Liganden TNF- $\alpha$ . Es wurde eine Korrelation zwischen Dysplasiegrad und dem Maß der EGFR-Überexpression gezeigt (Choong and Cohen 2006), (Dassonville, Formento et al. 1993). Des Weiteren hat sich gezeigt, dass sich diese Überexpression als früher Faktor der Karzinogenese eines SCCHN verwenden lässt, der die Theorie der Feldkanzerisierung stützt, da bei Patienten mit SCCHN schon in normaler Mucosa bereits eine bis zu 30fache Überexpression des EGFR festzustellen ist (Grandis and Twardy 1993).

Diese Überexpression von EGFR und seinem Liganden TNF- $\alpha$  kann auch als indirekter Hinweis darauf gedeutet werden, dass es zu einer autokrinen Stimulation der Zelle kommt, die auch als ein wichtiger Bestandteil der Karzinogenese diskutiert wird (Song and Grandis 2000).

## 1.4 Blockade der Zellaktivierung durch Chemotherapie

Primärer Therapieansatz bei Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes ist die chirurgische Resektion des Karzinoms. Allerdings gibt es auch die Möglichkeit chemotherapeutisch gegen den Tumor vorzugehen. Dabei unterscheidet man zwischen einer Induktionschemotherapie, einer adjuvanten und einer palliativen Chemotherapie.

### 1.4.1 Allgemeine Grundlagen der chemotherapeutischen Therapie

Ziel einer Chemotherapie ist es, möglichst selektiv die Tumorzellen zu vernichten und wenige Schäden bei gesunden Körperzellen anzurichten. Hierfür macht man sich den Umstand zunutze, dass Zellen mit einer hohen Mitoserate sehr sensibel für Chemotherapeutika sind, also auch und besonders Tumorzellen. Ein Nachteil hiervon ist, dass Zellen, die eigentlich gesund sind, aber ebenfalls eine hohe Mitoserate haben, auch von der Wirkung des Chemotherapeutikums betroffen sind. Dadurch lassen sich eine Reihe von Nebenwirkungen der chemotherapeutischen Intervention erklären. Zu den Zellen mit einer hohen Teilungsrate gehören Haarwurzelzellen, das Darmepithel, Lymphknoten und die Lymphozytenvermehrung und das Knochenmark. Besonders schwerwiegende Folgen kann eine Schädigung auf der Ebene der Keimzellen haben.

Prinzipielle Wirkmuster einer chemotherapeutischen Therapie ergeben sich bei Betrachtung der einzelnen Schritte des Zellzyklus.

1. Schädigung der Mitosespindel, durch Vinca-Alkaloide (führen zu Hemmung der Bildung der Mitosespindel) und Taxane (führen zu einer Hemmung des Abbaus der Mitosespindel)
2. Hemmung der DNS- / RNS-Synthese, durch alkylierende Zytostatika (zum Beispiel Cyclophosphamid), platinhaltige Verbindungen (zum Beispiel Cisplatin), die Induktion von Strangbrüchen oder die Hemmung der Bausteinsynthese (zum Beispiel durch Folsäureanaloga wie Methotrexat). Außerdem durch die Einschleusung falscher Basen oder Nucleoside.(Lüllmann H. 2003)
3. monoklonale Antikörper gegen GF-Rezeptoren
4. Tyrosinkinaseinhibitoren, die die Signaltransduktion unterbrechen



### 1.4.2 Chemotherapie bei SCCHN

In jüngerer Zeit zielen die chemotherapeutischen Therapien immer mehr darauf ab, Tumor-Assoziierte-Antigene (TAA), zu denen auch überexprimierte Oberflächenrezeptoren zählen, als Zielmoleküle für eine pharmakologische Beeinflussung zu verwenden.

Beispielsweise kann durch Modulation des EGFR die Signaltransduktion, und damit die Genexpression bestimmter Onkogene unterbrochen werden. Ein Ansatz ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die selektiv gegen EGFR gerichtet sind und die Ligandenbindestellen blockieren. Erste klinische Erfahrungen wurden mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab® gesammelt, der in einer Phase-II-Studie mit Patienten in Stadium III/IV eines rezidivierenden oder therapieresistenten Plattenepithelkarzinomes des oberen Aerodigestivtraktes als Monotherapie getestet wurde. Es zeigte sich, dass es ein signifikant gutes Ansprechen gegeben war, bei Patienten, die sonst nur wenige therapeutische Optionen besaßen (Baselga, Trigo et al. 2005).

Ein anderer Ansatz die über EGFR vermittelte Signaltransduktion zu hemmen besteht darin, Tyrosinkinaseinhibitoren zu verwenden, die die Phosphorylierung der Tyrosinkinasen am EGFR behindern, beziehungsweise unterbinden. Erfahrungen wurden hier mit ZD1839 (= Iressa®, Gefitinib) gesammelt, das in klinischen Studien gute Ergebnisse bei der Behandlung von kleinzelligen Bronchialkarzinomen gezeigt hat und auch positive Effekte bei der Behandlung von SCCHN haben soll (Choong and Cohen 2006).

Auch der Einsatz von Taxanen, wie dem synthetisch hergestellten Docetaxel, das als Spindelgift den Abbau der Mitosespindel hemmt, zeigten positive Effekte bei der Reduktion aktiver Tumorzellen (Schoffski, Weihkopf et al. 1998), (Schoffski, Wanders et al. 2000), (Schrijvers and Vermorken 1998).

Bisheriger Standard der Chemotherapie bei Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes ist und war der Einsatz von Cisplatin, das beim Einbau in die DNS Platin freisetzt, das dann an die DNS bindet und als interkalierende Substanz wirksam ist. Diese auf platinhaltigen Verbindungen basierenden Regime werden oft in Kombination mit 5-FU angewandt.

### **1.4.3 Chemotherapiesensibilität**

Es konnte demonstriert werden, dass die Sensibilität von Karzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika von der Phase des Zellzyklus abhängt, in der sich die Zelle befindet.

So konnte anhand von Leukämiezellen demonstriert werden, dass ein Verharren in der G0-Phase des Zellzyklus wahrscheinlich mit einem Sensibilitätsverlust gegenüber einer Chemotherapie einhergeht (Jedema, Barge et al. 2003), der Umkehrschluss aber auch möglich ist. Zumindest wurde an Zellen einer akuten myeloischen Leukämie gezeigt, dass ein Transfer von G0-Phase-Zellen in ein proliferatorisches Stadium des Zellzyklus, deren Sensibilität gegenüber Chemotherapie erhöhen kann (Jedema, Barge et al. 2004).

## 1.5 Zielsetzung

Eine Arbeitshypothese war, dass es möglich ist, auch bei SCCHN inaktive G0-Phase-Zellen mittels Stimulation durch Wachstumsfaktoren dazu zu bewegen, durch Proliferation sensibel für eine chemotherapeutische Intervention zu werden.

Man weiß, dass SCCHN-Zellen den Zellzyklus abhängig von bestimmten Signalen an ihren Wachstumsfaktorrezeptoren durchlaufen. Diese können durch Proteine, wie zum Beispiel Serotonin, EGF, IL-6 und anderen stimuliert werden, die dann einen Signaltransduktion unter anderem auch mittels STAT-3 in Gang setzen und dadurch die Genexpression in den Tumorzellen beeinflussen (Banes, Shaw et al. 2005), (McLemore, Grewal et al. 2001), (Berclaz, Altermatt et al. 2001).

In vitro haben wir diese Proteine auf ihre Fähigkeit hin untersucht, G0-Phase-Zellen zu aktivieren, damit diese an der Zellproliferation teilnehmen und dadurch sensibler für eine chemotherapeutische Intervention werden.

In Stimulationsversuchen zeigte sich, dass die Kombination von Serotonin und EGF als Stimulans am meisten dazu geeignet ist, die Zellen proliferieren zu lassen.

Um die Effektivität der Sensibilisierung zu überprüfen, haben wir alle untersuchten Zelllinien, also Detroit-562, A431 und UMSCC-10B mit vier verschiedenen Chemotherapeutika behandelt. Mit einem monoklonalen Antikörper gegen den EGFR, Mab425. Einem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 (Iressa®, Gefetinib). Einem Taxan, Docetaxel. Und Cisplatin als Alkylans.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Zentrifuge	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
Ultrazentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau, D
Photometer	Spectronic Unicam, Cambridge, England, UK
Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Mikroskop	Carl Zeiss GmbH, Jena, D
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
FACScan™ flow cytometer	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
BioRad Trans-Blot® SD	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Wärmeplatte	Torrey Pines Scientific Inc., San Marcos, CA, USA
Helios α	Spectronic Unicam, Cambridge, England, UK
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Kodak DigitalScience™ Image Station cf 440	Eastman Kodak GmbH, Stuttgart, D
Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Micromix 5	Euro / DPC® LTD, Gwynedd, Wales, UK
Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach, D

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Stripetten 5 / 10 / 25ml	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Corning Inc., Corning, NY, USA
Pipettenspitzen	STARLAB GmbH, Ahrensburg, D
PP-Röhrchen, steril	Greiner BioOne GmbH, Fichtenhausen, D

Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Zentrifugengefäße 0,5 / 1,5ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Küvetten	Brandt GmbH, Wertheim, D
Elektrophorese-Gele	CAMBREX Bioscience, East Rutherford, NJ, USA
Filterpapier	Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Pasteurpipetten	Brandt GmbH, Wertheim, D

### 2.1.3 Chemikalien

Methanol	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D
Aceton	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D
DTT (Dithiotreitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonfluorid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaVO <sub>4</sub> (Natrium-ortho-Vanadat)	Hofmann-La Roche Inc., Basel, CH

### 2.1.4 Primärantikörper

Akt Antikörper (Ak), polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-Akt Antikörper,	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
EGF-Rezeptor Ak, polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-Jak1 Ak, polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
p44/42 MAP Kinase Ak, polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
Phospho p44/42 MAPK Ak	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-Raf Ak, polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
Stat3 Ak, polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-Stat3 Ak, polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
K-67, monoklonal, Kaninchen IgG	DCS GmbH, Hamburg, D

### 2.1.5 Sekundärantikörper

Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
DCS-DetectionLine	DCS GmbH, Hamburg, D

### 2.1.6 Chemotherapeutika und Reagenzien

Cisplatin	Hexal AG, Holzkirchen, D
ZD1839 (Iressa®)	AstraZeneca GmbH, Wedel, D
Mab425	Merck KGaA, Darmstadt, D
Docetaxel	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Berlin, D
IL-6	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
GCSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Serotonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EGF(human)	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
Tumorzellmedium, Quantum263	PAA Laboratories, Pasching, A
Gentamycin 10mg/ml	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
Accutase™	PAA Laboratories, Pasching, A
Bradford Reagenz	Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Permout™ Mounting Medium	Proscitech, Kirwan, Australia
Western Lightning™ Chemiluminiscence Reagent Plus	PerkinElmer Life Sciences Inc., Bos- ton, MA, USA

**2.1.7 Puffer**

PBS Puffer 1X	PAA Laboratories, Pasching, A
Tris Puffer (TBS) 10X	60,5g Tris Base 87,6g NaCl ad 1000ml Aqua dest
TBST 10X	24,2g Tris Base 80g NaCl 10ml TWEEN-20
Waschpuffer TBST 1X	100ml TBST 10X 900ml Aqua dest.
Blocking Puffer	TBST 1X 5% Magermilchpulver
Anoden I Puffer	181,65g Tris Base ad 1000ml: 50% Methanol 50% Aqua dest.
Anoden II Puffer	15,13g Tris Base ad 1000ml: 50% Methanol 50% Aqua dest.
Kathodenpuffer	15,13g Tris Base 15,14g Glycin ad 1000ml: 50% Methanol 50% Aqua dest.
NET NP40 Puffer	50mM Tris Base(mit HCl auf pH= 7,4 titrieren) 6,61g Tris/HCl + 0,97g Tris Base 8,766g NaCl 0,744g EDTA 3ml NP40

	ad 1000ml Aqua dest.
Magermilchpuffer	5g Magermilchpulver 100ml PBST (= 5% Magermilchpuffer)
Roti®-Load 1	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D

### 2.1.8 Sonstiges

CycleTEST™ PLUS Reagent Kit	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Modfit LT™ Software	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
PolyScreen® PVDF Membran	NEN® Life Science Products, Boston, MA, USA
Kodak DigitalScience™ 1D Image Analysis Software	Eastman Kodak GmbH, Stuttgart, D

### 2.1.9 Zelllinien

Detroit-562	SCCHN, Pharynxkarzinom, Plattenepithel EGF-Rezeptor-Gehalt: 115,6 fM/mg Protein
A-431	Vulvakarzinom, Plattenepithel EGF-Rezeptor-Gehalt: 304 fM/mg Protein
UMSCC-10B	SCCHN, Larynxkarzinom Metastasen, Plattenepithel EGF-Rezeptor-Gehalt: 477,12 fM/mg Protein



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierte Zelllinien

Bei unseren Untersuchungen haben wir drei Zelllinien verwandt. Zum einen Detroit-562, deren Ursprung sich im Pharynxkarzinom findet. A431, ein Plattenepithelkarzinom, dessen Ursprung ein Vulvakarzinom ist. Diese beiden Zelllinien bezogen wir von ATCC (American type culture collection). Thomas Carey von der University of Michigan stellte uns freundlicherweise die Zelllinie UMSCC-10B zur Verfügung, deren Ursprung Metastasen eines Larynxkarzinoms sind (Koldovsky, Haas et al. 1995).

Bei den drei untersuchten Zelllinien handelt es sich um solche, die jeweils den EGFR überexprimieren. Dies ist bemerkenswert, da in unseren Überlegungen eine Stimulation der Zellproliferation über den EGFR-vermittelten Weg und später eine Blockade mittels Chemotherapie an diesem Punkt der Zellproliferation eine wichtige Rolle gespielt haben.

Am Beispiel der von Thomas Carey zur Verfügung gestellten Zelllinie UMSCC-10B möchte ich den Ablauf der Zellkultivierung erläutern.

### 2.2.2 Anlage einer Zellkultur

Zunächst erfolgte eine Zellaussaat von 2.500.000 Zellen pro Zellkulturflasche (Corning Inc., Corning, NY, USA). Hierbei wurden 10ml Zellsatz, mit je 250.000 Zellen/ml in die Kulturflaschen pipettiert. Insgesamt fand eine 3-phasige Untersuchung statt, bei der die untersuchten Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden. Pro Phase gab es eine Kontrollgruppe, die weder mit Stimulantien noch mit Chemotherapeutika behandelt wurde. Des Weiteren wurde eine Gruppe nur stimuliert, eine weitere Gruppe erhielt eine Stimulation und wurde anschließend chemotherapeutisch behandelt und eine vierte Gruppe erhielt keine Stimulation, dafür aber eine chemotherapeutische Behandlung.

In Vorversuchen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren hat sich gezeigt, dass eine Kombination von EGF und Serotonin die stärksten Effekte auf die Proliferation der von uns untersuchten Zelllinien hatte. Hieraus ergab sich, dass die Kulturen, die stimuliert wurden, einen Zusatz von 10mM/ml Serotonin und 10µg EGF (1:1000 verdünnt aus einer Stammlösung 1µg/µl) zum Medium erhielten.

### 2.2.3 Ablauf der Zellkultivierung

Einen Tag nach der Zellaussaat wurde das Kulturmedium (Quantum 263, Clompete medium for tumor cells with L-Glutamine, PAA Laboratories, Pasching, A) abpipettiert und durch Medium mit den entsprechenden Zusätzen für die jeweilige Probe ausgetauscht. Diese Ansätze wurden danach für zwei weitere Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der jeweilige Ansatz wieder abpipettiert und die Proben mit dem entsprechenden chemotherapeutischen Zusatz versehen. Zum gleichen Zeitpunkt wurde der Ansatz der ersten Untersuchungsphase, der nur stimuliert worden ist, geerntet und zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

Im Falle des Mab425 waren dies 20µl aus einer Stammlösung 5mg/ml (= 10µl/ml), die 10ml Medium hinzugefügt wurden. ZD1839 wurde in einer Konzentration von 41,2µM/l = 25µl dem Medium hinzugefügt, Docetaxel in einer Konzentration von 1,0nM/l = 330µl und Cisplatin in einer Konzentration von 5,15µM = 1,56µl.

Diese Ansätze wurden wiederum für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die restlichen Ansätze der ersten Untersuchungsphase, das heißt die Kontrollgruppe, der stimulierte und chemotherapierte Ansatz, sowie der nur chemotherapierte Ansatz geerntet und zur weiteren Verarbeitung vorbereitet.

Die Zellen, die eine zweite und dritte Untersuchungsphase durchliefen, wurden erneut stimuliert und zwei Tage bei 37°C bebrütet, bevor sie wieder mit Chemotherapeutika versehen wurden. Das Ernten der Zellen erfolgte simultan zu den Zeitpunkten, die für die Untersuchungsphase 1 beschrieben wurden.

### 2.2.4 Ernten der Zellen mit Accutase™

Accutase™ ist ein Agens, das proteolytische und kollagenolytische Eigenschaften kombiniert und Zellen, die in Kulturflaschen anhaften, innerhalb von wenigen Minuten zu lösen vermag (nähere Information: [www.paa.at](http://www.paa.at)).

Um die Zellkulturen unserer Versuchsreihen zu ernten, verwendeten wir Accutase™ als lytisches Agens, indem die Kulturflasche, nachdem das Medium abgesaugt und die Flasche mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gespült wurde, mit 5ml Accutase™ 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurde.

Danach wurde das Zelllysat in sterile PP-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) abpipettiert und die Zellkulturflasche nochmals mit PBS ausgespült, dies

dann auch abpipettiert und zu dem Zellysat gegeben. Diese Suspension wurde dann bei 1000 rpm für 5 Minuten in einer Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen, D) zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgeschüttet und die PP-Röhrchen mit 5ml PBS gefüllt. Dann wurden diese mittels des Vortex (Heidolph Instruments, Schwabach, D) wieder aufgerüttelt und das Lysat für die Analyseschritte weiterverarbeitet.

Zum einen wurde von jeder Probe 1ml in kleinere sterile PP-Röhrchen gefüllt. Davon wurde von jeder Probe eine Pipettenspitze auf einen Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, D) gegeben, ausgestrichen und über einer Heizplatte getrocknet. Jeder Zellausstrich wurde für 10 Minuten in Aceton fixiert. Der Rest der 1ml-Proben wurde nochmals zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und 1,5ml des CycleTEST™ PLUS Reagens (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) dazugegeben. Das Lysat nochmals aufgerüttelt, der Überstand abgeschüttet und zur Weiterverarbeitung mittels dem Western Blot Verfahren bei -80°C eingefroren.

Der Rest jeder Probe, also 4ml Zellysat wurde nochmals für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet, 0,5ml CycleTEST™ PLUS Reagenz dazugegeben und die Zellmasse bei -80°C tiefgefroren.

### **2.2.5 Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS Analyse)**

Im Rahmen der Vorversuche, die dazu dienten die geeignete Kombination der Wachstumsfaktoren zu ermitteln, die für die Stimulation unserer Zelllinien erforderlich war, wurde die FACS Analyse angewandt. Dies diente dazu, zu ermitteln in welcher Phase der Zellproliferation sich die Zellen der entsprechenden Probe überwiegend befanden.

Die FACS-Analyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächmolekülen und intrazellulären Proteinen. In unserem Fall diente es zur Messung des DNS-Gehalt in der entsprechenden Phase der Zellproliferation. Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden

diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern / Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen (Shapiro 2003) (Radbruch 2000).

In unseren Versuchen verwandten wir, nachdem die Zellen geerntet wurden das CycleTEST™ PLUS Reagent Kit, um die Zellen auf die Durchflusszytometrie vorzubereiten.

Dieses besteht aus 3 Lösungen und einer Pufferlösung, mit denen die zu untersuchenden Zellen vorzubehandeln sind.

- **Lösung A:** enthält Trypsin in einem Spermin-Tetrahydrochlorid-haltigen Puffer, das für die Auflösung von soliden Zellfragmenten und die Verdauung von Zellmembran- und Zytoskelettbestandteilen zuständig ist
- **Lösung B:** enthält Trypsininhibitor und Ribonuklease A in einer zitratstabilisierenden Pufferlösung mit Spermin-Tetrahydrochlorid, um die Trypsinaktivität zu inhibieren und RNA zu verdauen
- **Lösung C:** enthält Propidiumiodid (PI) und Spermin-Tetrahydrochlorid in einer zitratstabilisierenden Pufferlösung.
- **Pufferlösung:** enthält Natriumzitrat, Saccharose und Dimethylsulfoxid (DMSO) und ist zur Sammlung und zum Einfrieren der Zellsuspensionen geeignet.

Das CycleTEST™ PLUS Reagent Kit diente uns dazu, die Zellkerne zu isolieren, indem das Zytoskelett und Kernproteine mittels Trypsin verdaut wurden. Das Kernchromatin wurde mittels Spermin konserviert (stabilisiert) und im nächsten Schritt stöchiometrisch an Propidiumiodid gebunden, das als „Antikörper“ fungierte und somit eine FACS-Analyse möglich machte. Da die mit Propidiumiodid versehenen Zellkerne fluoreszierendes Licht der Wellenlänge zwischen 580 und 650nm emittieren. (Bach,

Knape et al. 1991) (Emdin, Stenling et al. 1987) (weiterführende Informationen, siehe: CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit, Verbraucherinformation)

Der zelluläre DNS-Gehalt wurde mittels des FACScan™ flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) analysiert. Es wurden mindestens 10.000 Zellen der untersuchten Proben analysiert und daraus der Gehalt an Zellen bestimmt, die sich in der G0-/G1-, der S- und der M-Phase des Zellzyklus befanden. Die Ergebnisse wurden mittels der Modfit LT™ Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) in prozentualen Angaben gemacht und analysiert.

### **2.2.6 Western Blot Analyse**

Der Western Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine aus Virus-Präparationen, Gesamt-Zell-Protein oder Gewebe-Lysaten nachgewiesen werden. Nach Auftrennung der Proteine, abhängig von ihrer Größe, im elektrischen Feld werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert ist oder an ein Enzym wie zum Beispiel Peroxidase oder Phosphatase gekoppelt ist, detektiert.

#### **2.2.6.1 Proteinextraktion**

Bevor jedoch die Gelelektrophorese und der Western Blot durchgeführt werden konnten, mussten aus den zu untersuchenden Proben Proteine aus den Zellen extrahiert werden. Hierzu wurde das Zelllysat, das in sterilen PP-Röhrchen bei -80°C tiefgefroren war, bei Zimmertemperatur für 10 Minuten angetaut.

Im Anschluss wurden der Extraktionspuffer, der aus einer Tablette Complete, Mini, EDTA-free Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim, D) in 10ml NET-NP40-Puffer aufgelöst besteht, auf das Zellpelett der entsprechenden Probe gegeben, sowie jeweils 10µl DTT (Dithiothreiol), PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), NaVO<sub>4</sub> (Natrium-ortho-Vanadat). Diese Suspension wurde dann in ein Eppendorf-Zentrifugengefäß (Eppendorf GmbH, Hamburg, D) überführt und mittels einer 1ml-Spritze, die mit einer 20G (Gauge) Kanüle versehen war, geschert. Daran schloss sich eine einstündige Inkubationszeit in Eiswasser bei 4°C an. Dann wurde die Zellsuspension für 20 Minuten in der vorgekühlten (auf 4°C) Ultrazentrifuge bei 16.000

rpm zentrifugiert, der Überstand enthielt die lysierten Proteine, die Peletts wurden verworfen.

### 2.2.6.2 Proteinmessung

Die Proteinmessung wird allgemein dazu verwendet, um eine Steigerung oder Hemmung der Proteinsynthese in einer Zelle nachzuweisen, die sich in einer Veränderung der Absorption gegenüber einem Leerwert ausdrückt. Hierzu wendeten wir das Verfahren nach Bradford an.

Der Leerwert wurde in einem Photometer (Helios  $\alpha$ , Spectronic Unicam, Cambridge, England, UK) bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen und das Photometer auf diesen Wert geeicht. Danach wurden die Proben mit den Proteinlysaten gemessen.

Die Zusammensetzung der Leerwertprobe bestand aus

- 200 $\mu$ l Bradford Reagenz
- 800 $\mu$ l Aqua dest.
- 1 $\mu$ l NET-NP40 Puffer

Dies wurde in eine Küvette (Brandt GmbH, Wertheim, D) gegeben und dann im Photometer vermessen.

Die Zusammensetzung der Proben bestand aus

- 200 $\mu$ l Bradford Reagenz
- 800 $\mu$ l Aqua dest.
- 1 $\mu$ l Proteinlysate

Dies wurde ebenfalls in eine Küvette gegeben und im Photometer vermessen.

Die daraus resultierenden Werte, dienten uns zur Bestimmung der für den Western Blot zu verwendenden Mengen an Protein, NET NP40-Puffer und Roti-Load® 1 (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D) als Laufpuffer.

### 2.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren oder Proteine aufgetrennt werden. Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, gebildet von einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere zu vernetzen. Als Katalysator wird TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat eingesetzt.

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein Detergens, das sich an Proteine anlagert und diese denaturiert. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist nun nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig.

In unseren Versuchen haben wir das Gel nicht selbst hergestellt, sondern ein vorgefertigtes gegossenes Polyacrylamidgel mit 12%igem SDS-Anteil verwendet, PAGEr® Precast Gels (CAMBREX BioScience, East Rutherford, NJ, USA).

Für ein Gel braucht man ca. 10-20µl Protein, das man in einen Slot des Geles gibt, in den insgesamt 30µl hineinpassen. Zum Protein müssen noch ca.  $\frac{1}{4}$  der Menge an Roti®-Load 1 dazugegeben werden. Dies alles wurde bei 95°C für 5 Minuten in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler, Eppendorf GmbH, Hamburg, D) denaturiert.

Dann wurde das Gel in das Elektrophoresesystem (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) eingesetzt. Hierfür wurde es in die vertikale Kammer des Systems eingesetzt, und die mittlere Kammer des Elektrophoresesystems mit Proteinlaufpuffer (1X) aufgefüllt. Dann wurde der Kamm aus dem Gel herausgezogen und das System gänzlich mit Proteinlaufpuffer aufgefüllt. Es wurden alle Taschen des Gels noch einmal separat mit Proteinlaufpuffer durchgespült, bevor in die erste Tasche des Gels ca. 10µl Markersubstanz eingefüllt wurde. Sukzessive wurden dann die restlichen Taschen des Gels mit den Proben gefüllt, sowie eine Tasche für eine Positivkontrolle.

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 130 V für ca. 5-10 Minuten gestartet, bis alle Proteine auf einer Höhe des Gels waren und eine gerade Linie bildeten. Danach wurde eine Spannung von 125 V angelegt. Nach ca. 1 Stunde war die Proteinauftrennung abgeschlossen. Das System wurde auseinander gebaut und das

Gel in einem Western Blot weiterverarbeitet.

#### 2.2.6.4 Proteintransfer / Western Blot

Der Proteintransfer erfolgte auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Transfer-Membran) (NEN PolyScreen® Transfer Membrane, NEN® Life Science Products, Boston, MA, USA). Dies ist eine feinporige Membran, die hydrophobe Eigenschaften besitzt und eine Porengröße von 0,45µm hat. Dies hat zur Folge, dass sie für Proteingrößen von bis zu 10 kDa verwandt werden kann.

Für den Aufbau des Proteintransfers benötigten wir verschiedene Pufferlösungen.

- Anodenpuffer I      181,65g Tris Base  
Ad 1000ml: 50% Methanol, 50% Aqua dest.
- Anodenpuffer II    15,13g Tris Base  
Ad 1000ml: 50% Methanol, 50% Aqua dest.
- Kathodenpuffer    15,13g Tris Base  
15,14g Glycin  
Ad 1000ml: 50% Methanol, 50% Aqua dest.

Zunächst wurde das Gel aus seiner Kassette entfernt und für 15 Minuten zur Vorbereitung auf den Proteintransfer in Kathodenpuffer gewaschen. Danach 2 Blotpapiere, die in das Format des Gels zugeschnitten wurden in Anodenpuffer I eingelegt, ein Blotpapier in Anodenpuffer II eingelegt und 3 Blotpapiere mit dem Kathodenpuffer getränkt. Die PVDF-Transfer-Membran wurde ebenfalls auf das Format des Gels zugeschnitten und 1 Minute in Methanol geschwenkt und anschließend 3-4 Mal mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss daran wurde sie in Anodenpuffer I eingelegt.



Der Aufbau des Transfers sah wie folgt aus (Reihenfolge der Schichtung):

- 2 mal Blotpapier mit Anodenpuffer I
- 1 mal Blotpapier mit Anodenpuffer II
- PVDF-Transfer-Membran
- Gel
- 3 mal Blotpapier mit Kathodenpuffer

Dieser Aufbau wurde dann mittels einer 10ml Pipette (Eppendorf GmbH, Hamburg, D), die darüber gerollt wurde von eventuell vorhandenen Luftblasen befreit und dann das Gerät, BioRad Trans-Blot® SD, Semi-Dry-Transfer-Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) per Deckel verschlossen.

Es wurde eine Spannung von 24 V (ca. 140 mA) für 1 Stunde angelegt. Nach Abschluss des so erfolgten Proteintransfers wurde die PVDF-Transfer-Membran für 1 Stunde mit Blocking Puffer blockiert, indem dieser dazu gegeben wurde und das ganze auf dem Duomax 1030 (Heidolph Instruments, Schwabach, D), einem Schüttelsystem, inkubiert wurde.

#### **2.2.6.5 Antikörperbeschichtung**

Um die Aktivität einzelner Proteine nachweisen zu können wurden die durch Western Blot auf PVDF-Transfer-Membranen transferierten Banden mit Antikörpern inkubiert.

Nach der Blockierung der Membranen wurden diese über Nacht im Kühlschrank bei 4°C mit Antikörpern inkubiert. Hierzu wurde der Blocking Puffer entfernt und durch den entsprechenden Antikörper, der in 5ml oder 10ml Milchpuffer gelöst war.

Wir verwendeten als Primärantikörper polyklonale Kaninchen-IgG gegen STAT-3, Akt, EGFR und p44/42 MAP Kinase (alle Antikörper von Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA). Bei den bereits phosphorylierten Proteinen der Signaltransduktion verwendeten wir ebenfalls polyklonale Kaninchen-IgG gegen pSTAT-3, pAkt, pJak1, p44/42 MAP Kinase und pRaf (alle Antikörper ebenfalls Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA).

Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D) verwandt, der sich an die Primärantikörper anlagerte.

Die Antikörper wurden in 5ml oder 10ml Milchpuffer verdünnt und die Membranen für 1 Stunde damit auf dem Duomax 1030 inkubiert. Danach wurden diese erst 5-mal für 5 Minuten mit PBST gewaschen. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper ebenfalls in Milchpuffer verdünnt dazugegeben und das Ganze für 1 Stunde auf dem Rocker inkubiert. Darauf folgte wieder eine Waschung mit PBST nach dem eben genannten Schema.

Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte die Auswertung der Membranen durch ein Chemoluminiszenz detektierendes System (Kodak Digital Science™ Image Station cf 440, Eastman Kodak GmbH, Stuttgart, D) und die entsprechende Software. Hierzu wurden die Membranen mit den Chemoluminiszenz-Reagenzien für 1 Minute inkubiert, um dann im System ausgewertet werden zu können.

### **2.2.7 Ki-67 Färbung**

Zellen jeder Probengruppe und Phase wurden auf Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, D) übertragen und für eine Färbung mit dem monoklonalen mouse-anti-human Antikörper gegen Ki-67 (DCS GmbH, Hamburg, D) vorbereitet.

Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, das mit der Zellproliferation zusammenhängt, es liegt während der Proliferationsphasen des Zellzyklus im Kern vor, also während der G1-, G2-, S- und M-Phase, wird aber nicht während der G0-Phase gefunden. (Gerdes, Lemke et al. 1984; Gerdes, Li et al. 1991; Gerdes, Becker et al. 1992)

Der monoklonale MIB-1-Antikörper reagiert mit dem nukleären Ki-67 und kann mit einem Sekundärantikörper angefärbt werden, so dass sich durch die Färbung die Zellen, die aktiv an der Proliferation teilnehmen in einer bestimmten farblichen Kodierung darstellen. In unserem Fall wurden diese rot angefärbt. Nicht angefärbte Zellen stellten sich blau dar und partizipieren somit nicht an der Zellteilung.

#### **2.2.7.1 Probenvorbereitung**

Bevor die Proben auf den Objektträger gegeben wurden, wurde mit einem PAP-Pen (aus: DCS-DetectionLine, DCS GmbH, Hamburg, D) ein Bereich umrandet, in den die Zellen eingeträufelt wurden.

Die Objektträger mit den Zellaustriichen wurden für 1 Stunde auf einer Wärmeplatte luftgetrocknet und dann in einem weiteren Schritt in einem Aceton-Methanol-

Gemisch (1:1) für 10 Minuten fixiert. Danach wurden sie in einem Bad aus Waschpuffer verwahrt, bis zur weiteren Verarbeitung mit dem DCS-DetectionLine-System.

### 2.2.7.2 Färbung

Die Färbung erfolgte mit dem DCS-DetectionLine, einem Färbesystem, das sowohl den Primärantikörper gegen Ki-67 enthält, als auch den biotinylierten Sekundärantikörper und ein Konjugat aus Streptavidin mit Alkalischer Phosphatase.

Zunächst erfolgte der Peroxidaseblock, das heißt die Inkubation der Objektträger mit Peroxid-Block (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 3 Minuten, daran schloss sich eine 2-minütige Waschung mit Waschpuffer TBST 1x (100ml TBST 10x auf 900ml Aqua dest.) an.

Im nächsten Schritt wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper gegen Ki-67 für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Der von uns verwendete Antikörper gegen Ki-67 lag in einer Verdünnung von 1:200 vor und war ein monoklonales Kaninchen IgG.

Es erfolgte im Anschluss eine erneute 2-minütige Waschung mit Waschpuffer TBST 1x.

Als nächstes wurden die Objektträger mit dem Sekundärantikörper beschichtet. Dieser besteht aus einem polyvalenten Link, der aus biotyniliertem Ziegen-IgG besteht, das eine Antigenspezifität gegen Maus-, Ratte-, Meerschweinchen- und Kaninchen-IgG hat. Außerdem enthält das Nachweissystem noch ein Label, das aus einem Konjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase besteht. (DCS-DetectionLine, DCS GmbH, Hamburg, D).

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Daran schloss sich wieder eine 2-minütige Waschung mit Waschpuffer TBST 1x an, bevor die Objektträger mit dem Konjugat aus Alkalischer Phosphatase und Streptavidin für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Nachdem die Objektträger mit dem Nachweissystem beschichtet wurden, sind sie 3 Mal für je 2 Minuten mit 1x Waschpuffer gewaschen worden.

Anschließend erfolgte die Färbung mit dem gewünschten Chromogen, in unserem Fall war dies Fuchsin, für 5-10 Minuten. Die Objektträger wurden dann noch dreimal einer Waschung mit 1x Waschpuffer für je 2 Minuten unterzogen.

Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxilin für 1 Minute.

Anschließend wurden die Objektträger mit Leitungswasser abgespült und in einer Küvette für Objektträger in Leitungswasser zum „Bläuen“ für ca. 5 Minuten verwahrt.

### **2.2.7.3 Zellzählung Ki-67-positiver Zellen**

Die Auswertung der Zellausstriche erfolgte, indem die Anzahl der G0-Phase-Zellen der Anzahl der Ki-67-positiven, also G1-, G2-, S- und M-Phase-Zellen gegenübergestellt wurden.

Hierzu wurde ein Raster auf den Objektträgern angelegt, das es ermöglichte, die Zellanzahlen in 3 vertikalen Reihen zu bestimmen. Diese Zählung wurde 3-mal wiederholt und dann die Ergebnisse gemittelt.

### **2.2.8 Kontrollgruppen**

Die Kontrollgruppen jeder Zelllinie, also Detroit-562, A431 und UMSCC-10B, wurden während der gesamten Zeit der Versuchsreihen nicht mit Reagenzien behandelt. Es wurde lediglich in einem 2-tägigen Abstand das Kulturmedium für Tumorzellen gewechselt. Diese Kontrollgruppen dienten uns dazu, festzustellen, welchen Effekt keine Behandlung auf die Proliferation der Tumorzellen hatte.

Um die Behandlungseffekte abschätzen zu können, verglichen wir die Proben, die eine Stimulation und eine chemotherapeutische Intervention erhielten mit denen, die eine chemotherapeutische Monointervention erhalten haben.

### 2.3 Statistik

Die erhobenen Daten wurden in zwei Datenbanken, die wir mittels Excel (Microsoft, Redmond, USA) erstellten, festgehalten. In einer Datenbank hielten wir die mittels Kodak DigitalScience™ 1D Image Analysis Software in Pixeln gemessenen Werte für die Proteinaktivität der Proteine der Signaltransduktion fest. In einer anderen Datenbank wurde die Zellanzahl der G0-Phase-Zellen festgehalten.

Die statistische Auswertung der absoluten Zellanzahl bezogen auf die G0-Phase-Zellen in den einzelnen Untersuchungsproben, erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS (Version 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und den darin anwendbaren Tests. Wir verwendeten den Mann-Whitney-U-Test und den Wilcoxon-Test, um zu überprüfen, ob die Anzahl der G0-Phase-Zellen bei Vorstimulation mit anschließender Chemotherapie reduziert ist im Vergleich zu einer alleinigen Chemotherapie. Ein signifikanter Unterschied ergab sich ab einem  $p < 0.05$ .

Zur graphischen Veranschaulichung wurden Graphen in Form von Säulendiagrammen mit Hilfe von Excel erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Stimulation von Detroit-562

#### 3.1.1 Stimulation der Zellen mit EGF, Serotonin, Interleukin-6 und GCSF unterschiedlicher Konzentration

Im Rahmen der Stimulationsversuche kultivierten wir eine Zellaussaat von Detroit-562, die wir mittels FACS-Analyse auf die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen untersuchten, um herauszufinden, welche Wachstumsfaktoren die stärksten Effekte auf die Proliferation der Zellen haben.

Hierzu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Stimulans inkubiert.

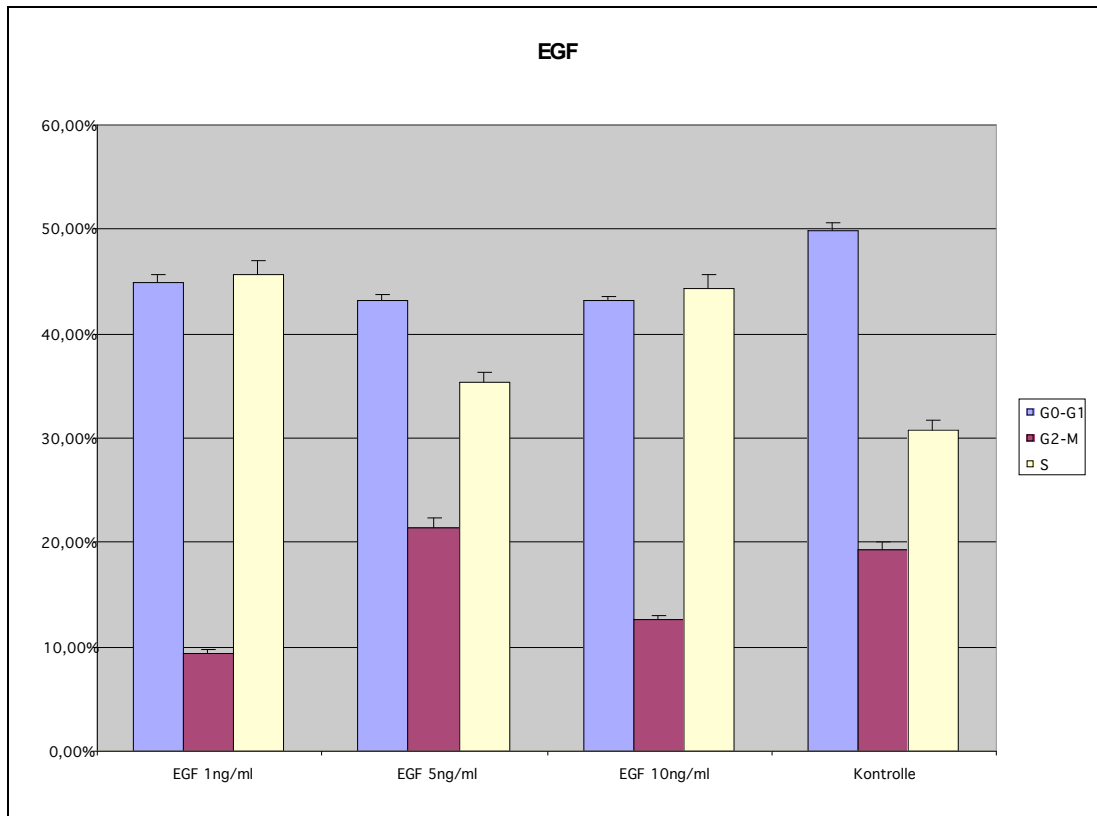
##### 3.1.1.1 Stimulation mit EGF

Im Falle des EGF waren dies Konzentrationen von 1ng/ml, 5ng/ml und 10ng/ml, die aus einer Stammlösung 1µg/µl mit einer Verdünnung von 1:1000 (=1ng/µl) gewonnen wurden.

Es zeigte sich, dass EGF alleine in einer Konzentration von 10ng/ml den stärksten Effekt auf die Proliferation der Zellen hatte. Es wurden 12,52% der Zellen in der G2- oder M-Phase des Zellzyklus gefunden, 44,39% der Zellen befanden sich in der S-Phase. Im Gegensatz dazu hatte eine Konzentration von 5ng/ml EGF eine stärkere Verteilung der Zellen zugunsten der G2- oder M-Phase zur Folge, 21,45%. Die S-Phase war mit 35,27% weniger stark exprimiert.

Bei einer Konzentration von 1ng/ml EGF befanden sich 9,31% der Zellen in der G2- oder M-Phase des Zellzyklus und 45,70% in der S-Phase.

In der Kontrollgruppe, die keine Stimulation erhielt, befanden sich 19,34% der Zellen in der G2- oder M-Phase des Zellzyklus und 30,77% in der S-Phase.



**Abbildung 3 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei einer Stimulation durch EGF in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigt sich bei einer Stimulation mit 5ng/ml EGF eine Steigerung der Zellen in der G2- oder M-Phase.**

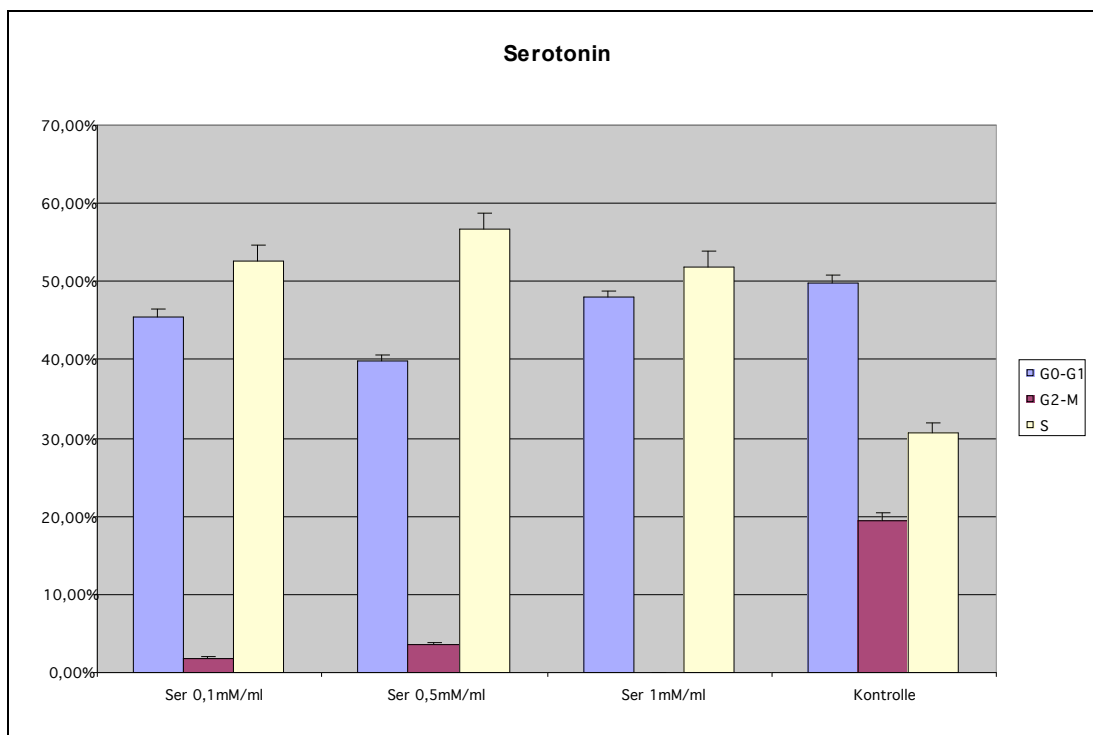
### 3.1.1.2 Stimulation mit Serotonin

Bei Stimulation durch Serotonin verwendeten wir Konzentrationen von 0,1mM/ml, 0,5mM/ml und 1mM/ml. Diese wurden aus einer Stammlösung der Konzentration 10mM/ml durch Verdünnung gewonnen.

Es zeigt sich, dass eine Konzentration von 0,5mM/ml Serotonin einen starken Effekt auf die proliferativen Phasen des Zellzyklus der Detroit-562 hat. Es befanden sich 3,53% der Zellen in der G2- oder M-Phase des Zellzyklus und 56,61% in der S-Phase.

Eine Konzentration von 0,1mM/ml führte dazu, dass 1,87% der Zellen in der G2- oder M-Phase des Zellzyklus waren und 52,57% in der S-Phase. Eine Konzentration 1mM/ml ergab 0,00% G2- oder M-Phase-Zellen und 51,98% S-Phase-Zellen.

Die Kontrollgruppe war mit 19,34% G2- oder M-Phase-Zellen und 30,77% S-Phase-Zellen idem der Kontrolle bei der Stimulation durch EGF.



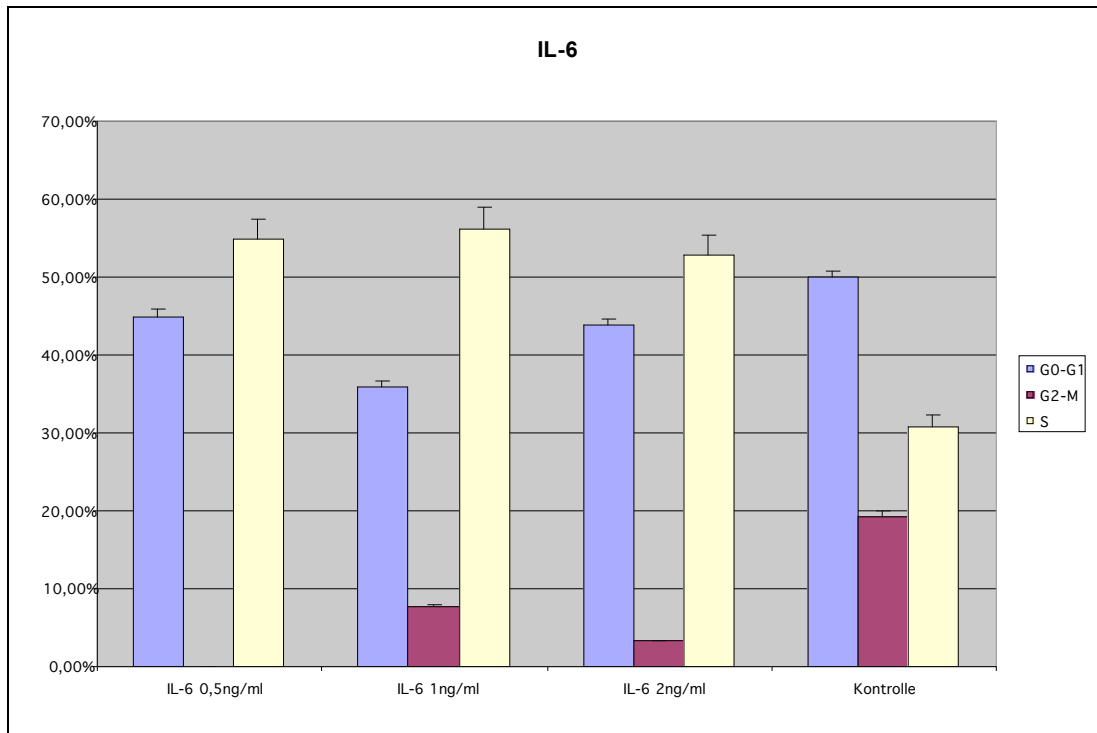
**Abbildung 4 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit Serotonin in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Es zeigt sich eine deutliche Steigerung der S-Phase-Zellen und eine deutliche Reduktion der G0- und G1-Phase-Zellen bei 0,5mM/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ähnliche Effekte konnten bei einer Konzentration von 0,1mM/ml beobachtet werden.**

### 3.1.1.3 Stimulation mit Interleukin-6

Bei der Stimulation mit Interleukin-6 (IL-6) verwendeten wir Konzentrationen von 0,5ng/ml, 1ng/ml und 2ng/ml, die durch eine 1:100 Verdünnung aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 4ng/μl gewonnen wurden.

Es zeigt sich, dass eine Stimulation mit IL-6 in einer Konzentration von 0,5ng/ml 0,11% der Zellen in die G2- oder M-Phase brachte und 54,93% in die S-Phase. Bei einer Konzentration von 1ng/ml waren dies 7,74% G2- oder M-Phase-Zellen und 56,24% S-Phase-Zellen. Die Kontrollgruppe war idem der Kontrollgruppen bei Stimulation mit EGF und Serotonin.



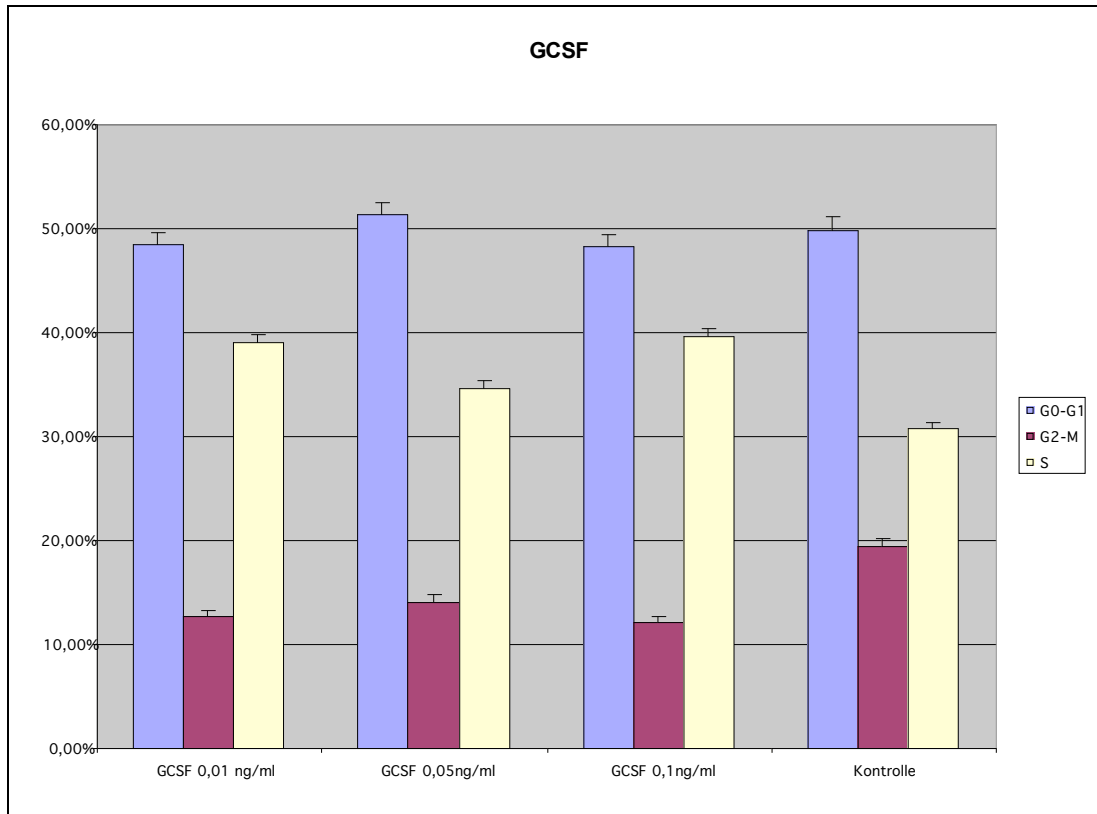


**Abbildung 5 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit IL-6 in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich, dass eine Konzentration von 1ng/ml zu einer Steigerung der S-Phase-Zellen führte.**

### 3.1.1.4 Stimulation mit GCSF

Bei der Stimulation der Zellen mit GCSF verwendeten wir Konzentrationen von 0,01ng/ml, 0,05ng/ml und 0,1ng/ml GCSF, die aus einer Stammlösung der Konzentration 10ng/ml 1:1000 verdünnt wurden.

Bei einer Konzentration von 0,01ng/ml GCSF befanden sich 12,64% der Zellen in G2- oder M-Phase des Zellzyklus und 38,97% in der S-Phase. Durch die Steigerung der Konzentration auf 0,05ng/ml fanden sich nun 14,07% der Zellen in der G2- oder M-Phase und 34,67% in der S-Phase. Bei einer Konzentration von 0,1ng/ml GCSF waren dies dann 12,13% G2- oder M-Phase-Zellen und 39,59% S-Phase-Zellen. Die Kontrollgruppe erwies sich mit 19,34% G2- oder M-Phase-Zellen und 30,77% S-Phase-Zellen, identisch zu den Kontrollen, der mit EGF, Serotonin und IL-6 stimulierten Zellen.



**Abbildung 6 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit GCSF in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Bei einer Konzentration von 0,01ng/ml und 0,1ng/ml war eine deutliche Steigerung der Zellen in der S-Phase gegenüber der Kontrollgruppe feststellbar.**

Da sich kein wirklich gravierender Unterschied in der Einzelstimulation mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren zeigte, haben wir in einem zweiten Stimulationsversuch jeden Wachstumsfaktor miteinander kombiniert, um die bestmögliche proliferationsfördernde Wirkung herausfinden zu können.

### 3.1.2 Stimulation von Detroit-562 mit Kombinationen der Wachstumsfaktoren

#### 3.1.2.1 Stimulation mit IL-6 kombiniert mit Serotonin, EGF oder GCSF

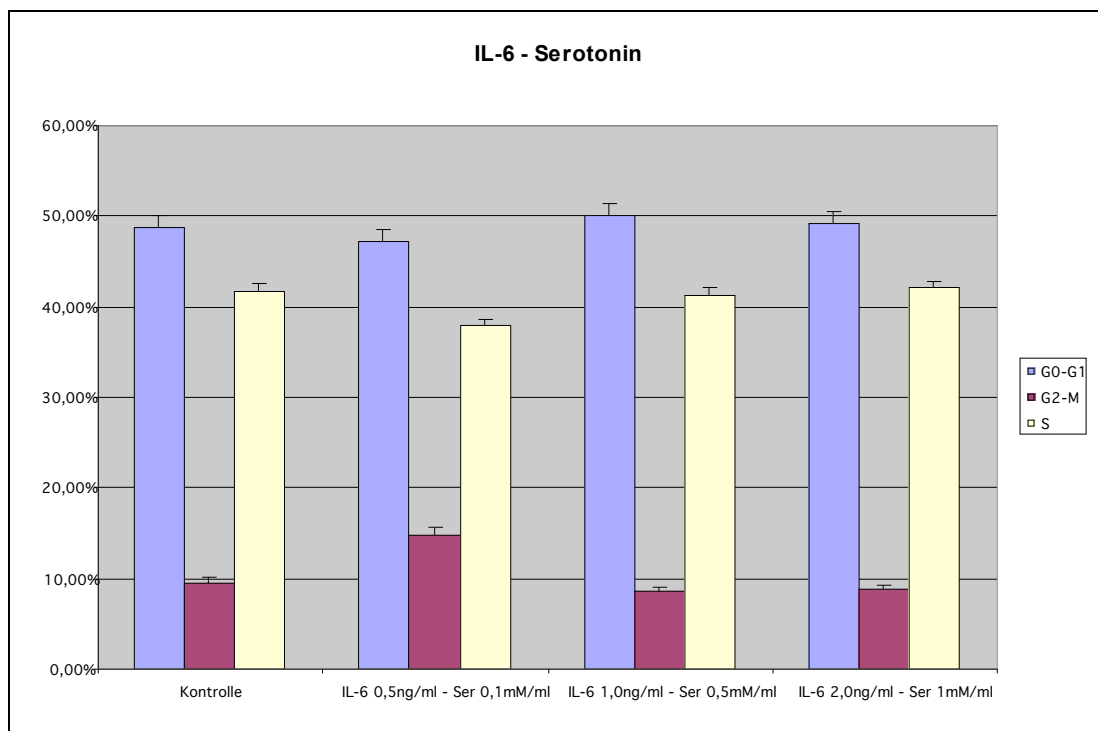
Es wurden wie bei der Monostimulation mit den Wachstumsfaktoren, Konzentrationen von 0,5ng/ml, 1,0ng/ml und 2,0ng/ml IL-6 verwendet, die mit Serotonin (Konzentrationen von 0,1, 0,5 und 1,0mM/ml), EGF (Konzentrationen von 1, 5 und 10ng/ml) und GCSF (Konzentrationen von 0,01, 0,05 und 0,1ng/ml) kombiniert wurden. Mit diesen Kombinationen wurden dann Detroit-562 inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigte sich, dass die Effekte, die eine Stimulation mittels IL-6 in Kombination mit

Serotonin, EGF und GCSF auf die Proliferation der Zellen haben, ähnlich zu einander ausfielen. So befanden sich bei der Kombination IL-6 (0,5ng/ml) und Serotonin (0,1mM/ml) 14,82% der Zellen in der G2- oder M-Phase und 37,87% in der S-Phase, und damit in einem proliferativen Stadium des Zellzyklus.

Auch eine Steigerung der Konzentrationen der Wachstumsfaktoren änderte nichts Wesentliches am Verteilungsmuster der Zellen. Bei einer Konzentration von 1,0ng/ml IL-6 und 0,5mM/ml Serotonin waren 8,62% der Zellen in der G2- oder M-Phase und 41,27% in der S-Phase des Zellzyklus. Eine weitere Steigerung der Konzentrationen auf 2ng/ml IL-6 und 1mM/ml Serotonin brachte keine wesentliche Steigerung der Proliferation (8,74% in G2- oder M-Phase und 42,07% in S-Phase) (Abbildung 7).

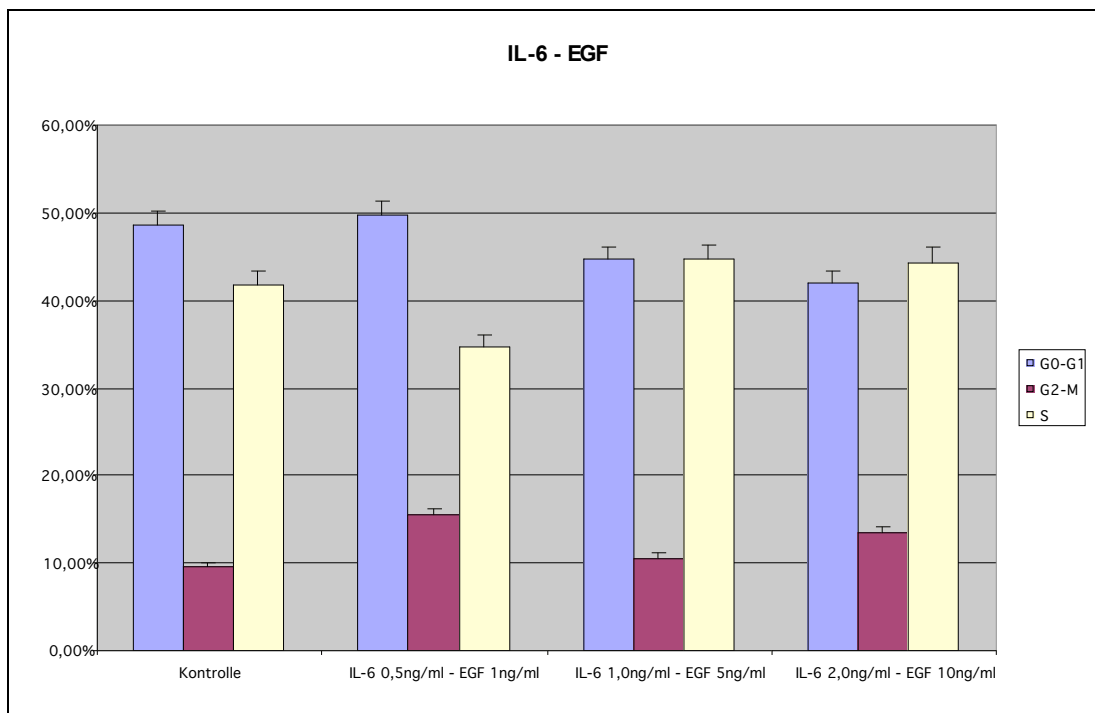
Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keiner Stimulation unterzogen wurde, zeigte sich kein deutlich erkennbarer Unterschied. In der Kontrollgruppe fanden sich 9,52% der Zellen in der G2- oder M-Phase und 41,8% der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus.



**Abbildung 7 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen bei Detroit-562 bei Stimulation mit IL-6 in Kombination mit Serotonin in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Es zeigte sich, dass hierbei eine deutliche Steigerung der Zellen in der G2- und M-Phase gegenüber der Kontrollgruppe durch eine Konzentration von 0,5ng/ml IL-6 und 0,1mM/ml Serotonin erzielt werden konnte.**

Ähnliche Effekte wurden bei der Kombination von IL-6 mit EGF beobachtet. Eine

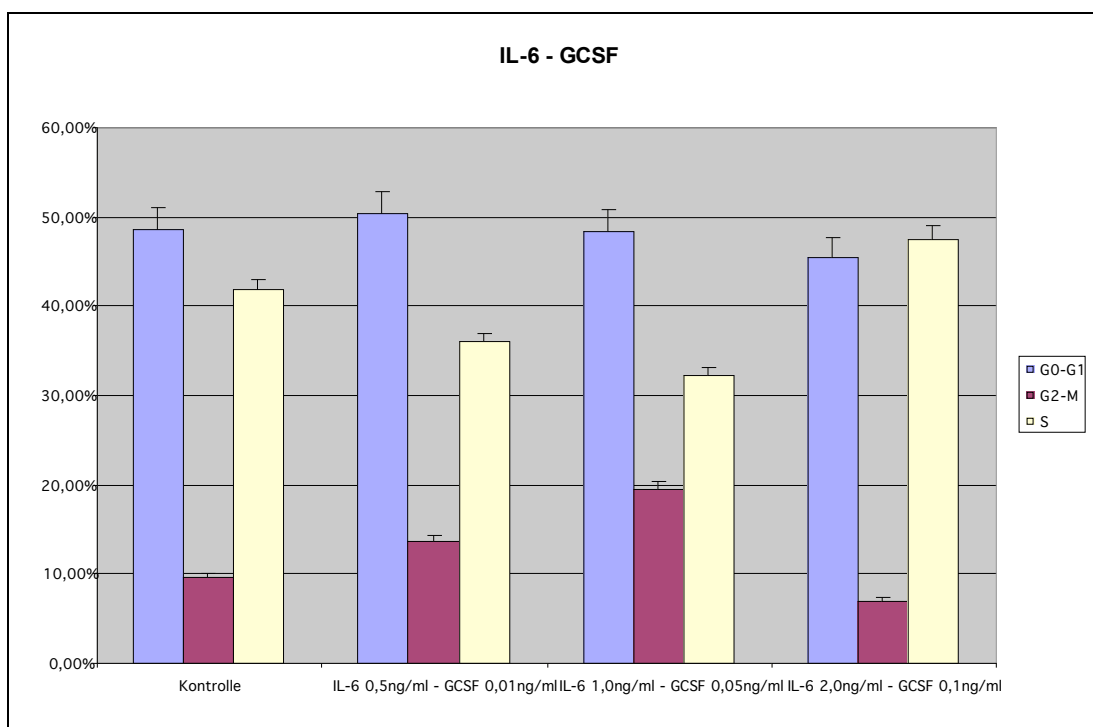
Steigerung der Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren bedeutete nicht automatisch eine deutlich erkennbare Steigerung der Zellproliferation (Abbildung 8).



**Abbildung 8 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit IL-6 in Kombination mit EGF in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Es zeigte sich, dass über die verschiedenen Konzentrationen betrachtet, das Verhältnis der aktiven zu den inaktiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine wesentlichen Veränderungen erbrachte.**

Auch die Kombination von IL-6 und GCSF brachte keine deutliche Steigerung der Proliferationsraten der Zellen mit sich. Erst ab einer Konzentration von 2ng/ml IL-6 und 0,1ng/ml GCSF steigerte sich die Anzahl der proliferatorischen Zellen gegenüber den geringeren Konzentrationen merklich. Es befanden sich 6,98% der Zellen in der G2- oder M-Phase und 47,55% der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (Abbildung 9).

Gegenüber der Kontrollgruppe war allerdings keine deutliche Steigerung der Proliferation feststellbar. In dieser Gruppe befanden sich 9,52% der Zellen in der G2- oder M-Phase und 41,80% in der S-Phase des Zellzyklus.



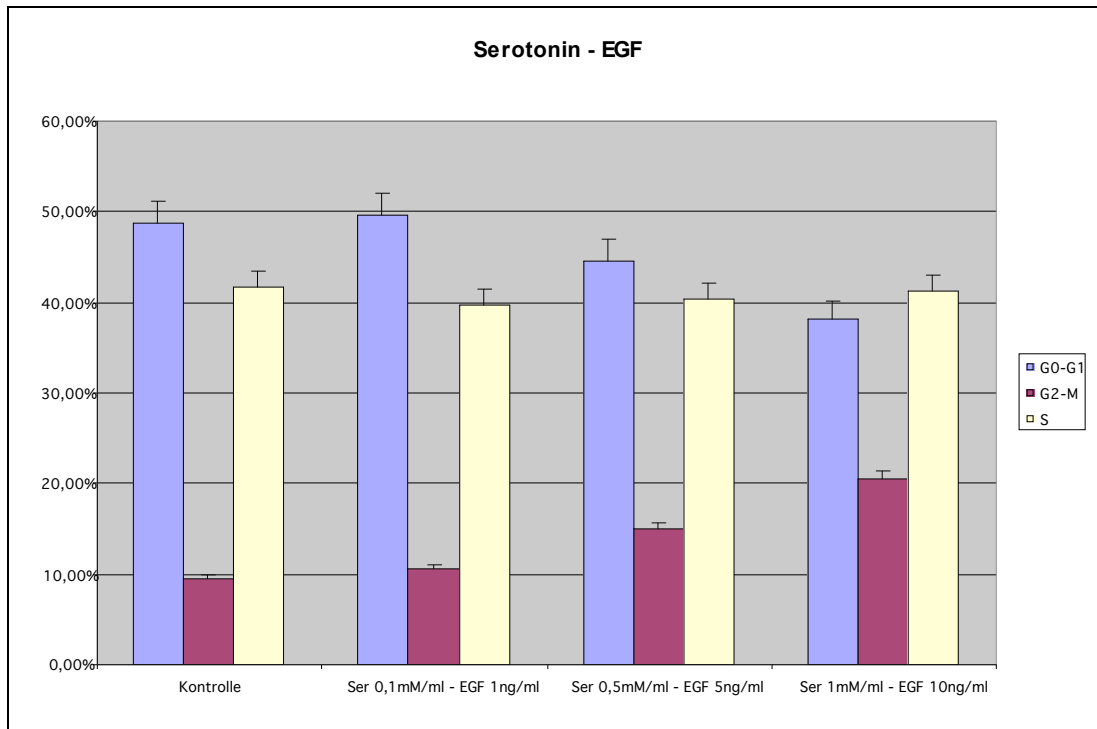
**Abbildung 9 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit IL-6 in Kombination mit GCSF in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 1,0ng/ml IL-6 und 0,5ng/ml GCSF zu einer deutlichen Steigerung der G2- und M-Phase-Zellen führte, die S-Phase-Zellen aber deutlich erniedrigt waren.**

### 3.1.2.2 Stimulation mit Serotonin kombiniert mit EGF und GCSF

Bei der Stimulation mittels Serotonin verwendeten wir Konzentrationen von 0,1, 0,5 und 1mM/ml und kombinierten diese zunächst mit EGF in Konzentrationen von 1,5 und 10ng/ml.

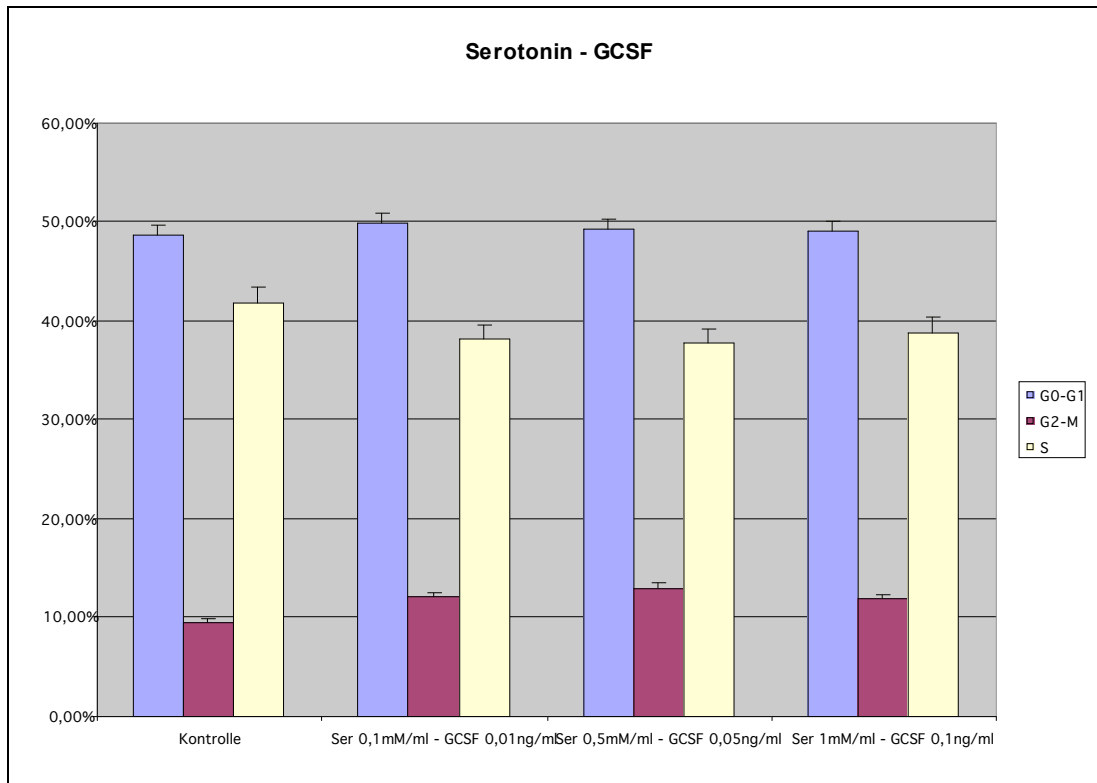
Es zeigte sich, dass eine Kombination dieser beiden Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von 1mM/ml Serotonin und 10ng/ml EGF einen deutlichen Effekt auf die Proliferation der Zellen hatte. So befanden sich bei diesen Konzentrationen 20,52% in der G2- oder M-Phase des Zellzyklus und 41,32% in der S-Phase des Zellzyklus (Abbildung 10).

Sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 9,52% G2- oder M-Phase-Zellen und 41,80% S-Phase-Zellen als auch im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen der beiden Wachstumsfaktoren, war dies eine deutliche Zunahme der Proliferationsraten.



**Abbildung 10 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit Serotonin in Kombination mit EGF in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Im Vergleich zu Kontrollgruppe zeigte sich besonders bei der Kombination 1mM/ml Serotonin mit 10ng/ml EGF eine deutliche Steigerung der G2- und M-Phase-Zellen Auch der Anteil der S-Phase-Zellen wies ein der Kontrollgruppe vergleichbares Ergebnis auf, so dass insgesamt eine deutliche Steigerung der proliferierenden Zellen gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten war.**

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Stimulation durch Serotonin und GCSF in verschiedenen Konzentrationen (0,01, 0,05 und 0,1ng/ml), so erkennt man auch hier eine deutlichere Proliferationszunahme bei der Stimulation durch Serotonin und EGF. Der Anteil der G2- oder M-Phase-Zellen bleibt bei allen Konzentrationen ungefähr gleich (Abbildung 11). Er schwankt zwischen 11,98% bei Stimulation mit 1mM/ml Serotonin kombiniert mit 0,1ng/ml GCSF und 12,99% bei Stimulation mit 0,5mM/ml Serotonin kombiniert mit 0,05ng/ml GCSF.

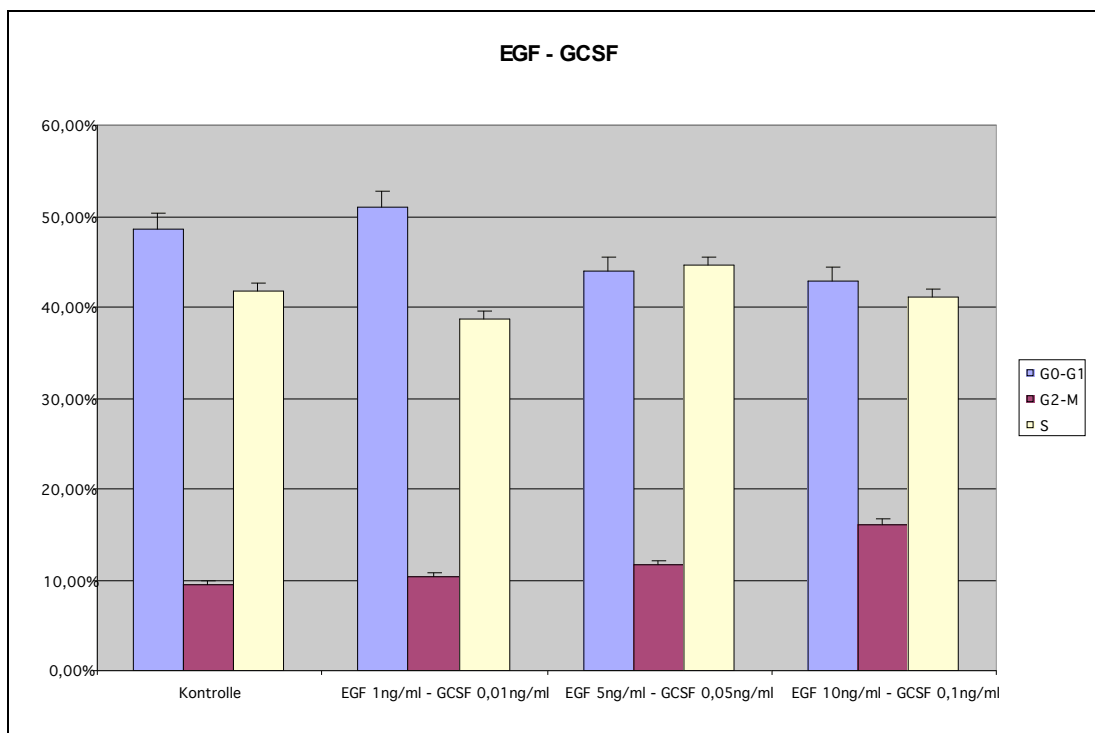


**Abbildung 11 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen der Zelllinie Detroit-562 bei Stimulation mit Serotonin in Kombination mit GCSF in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im Aktivitätsgrad der Zellen.**

### 3.1.2.3 Stimulation mit EGF kombiniert mit GCSF

Bei der Stimulation mittels EGF wurden Konzentration idem denen der Monostimulationen verwendet, also 1, 5 und 10ng/ml EGF und diese dann mit GCSF kombiniert.

Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 10ng/ml EGF und 0,1ng/ml GCSF der stärkste Effekt auf die Proliferation der Zellen zu erzielen war. Es befanden sich ca. 16% der Zellen in der G2- oder M-Phase des Zellzyklus und ca. 41,13% in der S-Phase (Abbildung 12).



**Abbildung 12 FACS-Analyse: prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen bei Detroit-562 durch eine Stimulation mit EGF in Kombination mit GCSF als Wachstumsfaktoren in unterschiedlicher Konzentration. Angabe der prozentualen Verteilung und der Standardabweichung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich keine wesentliche Veränderung der Aktivität in den verschiedenen Zellzyklusphasen.**

Im Vergleich zur Stimulation mittels Serotonin und EGF waren die Effekte hier aber nicht so deutlich, so dass wir uns bei den Versuchen, in denen die Zellen zusätzlich chemotherapeutisch behandelt wurden, für den Einsatz von 1mM/ml Serotonin und 10µg/µl EGF entschieden.



## 3.2 Stimulation der Zelllinien und chemotherapeutische Intervention

Im Rahmen der Zellstimulation inkubierten wir eine Zellaussaat jeder Zelllinie (A431, Detroit-562 und UMSCC-10B) von 2.500.000 Zellen und stimulierten diese mit Serotonin (1mM/ml) und EGF (10µg/µl). Der Versuchsaufbau umfasste 3 Phasen, jeweils mit einer Kontrollgruppe, einer Gruppe, die ausschließlich stimuliert wurde, einer Gruppe, die stimuliert und dann mittels Chemotherapie durch Mab425 (10µg/ml), ZD1839 (41,2µM/l), Docetaxel (1nM/l) und Cisplatin (5,15µM/l) behandelt wurde. Und eine Gruppe, die ausschließlich chemotherapeutisch mit den genannten Therapeutika behandelt wurde. Nach der Stimulation mit Serotonin und EGF wurde in einem 2tägigen Wechsel erst das Medium mit den Stimulantien gewechselt und durch mit den entsprechenden Chemotherapeutika ersetzt. Im Anschluss wurden die Proben ausgewertet.

Bei der Auswertung wurde nach Kernfärbung mittels eines Antikörpers gegen Ki-67, die Anzahl der aktiven (rot) den inaktiven (blau) Zellen gegenübergestellt. Diese Werte wurden nach absoluter Zellanzahl und prozentualer Verteilung bewertet.

Eine weitere Auswertung erfolgte durch die beim Western Blot erhaltenen Aktivitätsgrade der einzelnen Proteine der Signaltransduktionskaskade. Beobachtet wurden hierbei die Aktivitäten von phosphoryliertem Raf (pRaf), der MAPK, der phosphorylierten MAPK (pMAPK), des EGFR, von Aktin und phosphoryliertem Aktin (pAktin), von STAT-3 und phosphoryliertem STAT-3 (pSTAT-3).

### 3.2.1 Chemotherapie mit Mab425 und ZD1839

Bei der Auswertung der Ki-67 gefärbten Zellen zeigte sich, dass eine Therapie mit Mab425 und ZD1839 nach vorheriger Stimulation mittels Serotonin und EGF bei allen untersuchten Zelllinien zu einer Reduktion der G0-Phase-Zellen führte, wenn man diese mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglich.

### 3.2.1.1 Zellzählung bei mit Mab425 behandelten Zellen

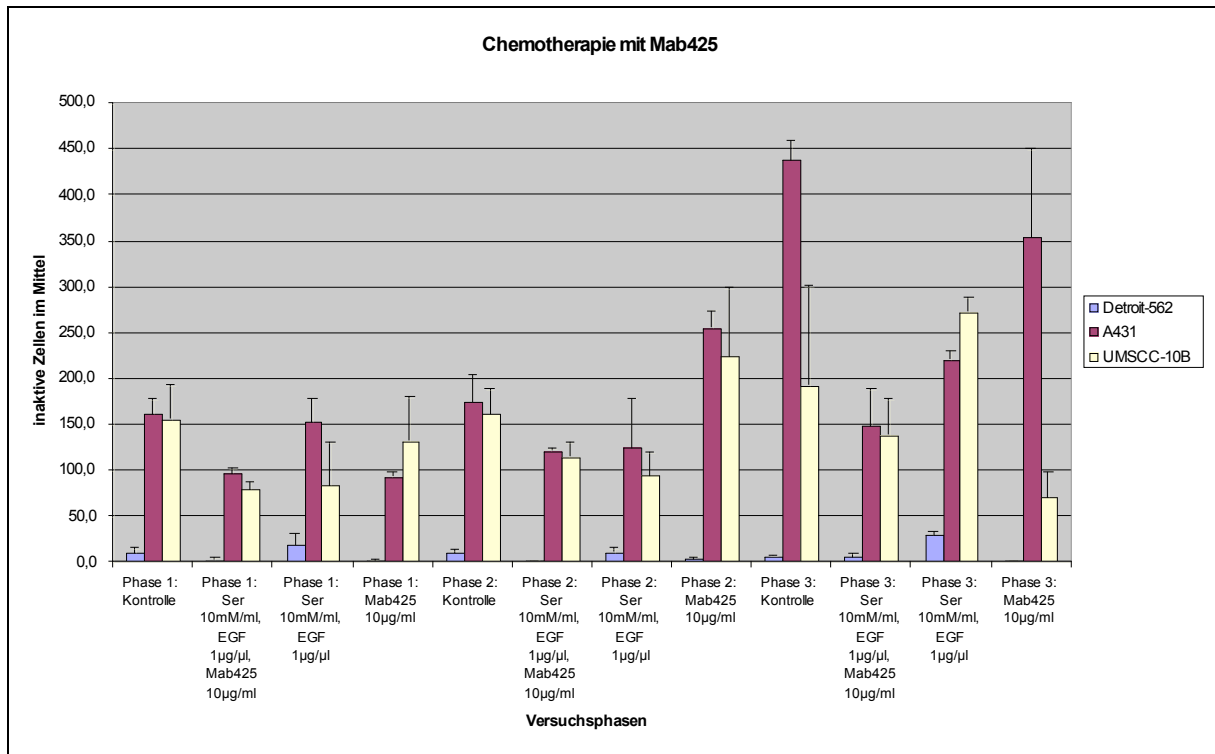
Bezogen auf die Kontrollgruppen zeigte sich, dass eine Stimulation mit Serotonin und EGF vor einer chemotherapeutischen Intervention mittels Mab425 eine Reduktion der Anzahl der inaktiven Zellen mit sich brachte. Dieser Effekt war über alle Versuchsphasen und bei allen untersuchten Zelllinien feststellbar.

So reduzierte sich bei Detroit-562 die mittlere Anzahl der inaktiven Zellen in Phase 1 unter Zugabe von 10nM/ml Serotonin, 1µg/µl EGF und 10µg/ml Mab425 auf 2,7 im Vergleich zur Kontrollgruppe, die im Mittel 10,0 inaktive Zellen aufwies. Für Phase 2 galten ähnliche Werte. 9,7 Zellen im Mittel in der Kontrollgruppe zu 1,0 Zellen im Mittel bei Zugabe der Vorstimulation und Chemotherapie. Auch in Phase 3 war dieser Effekt beobachtbar, allerdings nicht sehr ausgeprägt, 6,5 Zellen im Mittel (Kontrolle) zu 6,3 Zellen im Mittel (Vorstimulation und Chemotherapie).

Auch bei den Zelllinien A431 und UMSCC-10B zeigten sich diese Effekte.

In Bezug auf die alleinige Gabe von Mab425 als Chemotherapeutikum zeigte sich, dass hierbei über alle Zelllinien betrachtet ein höherer Anteil an G0-Phase-Zellen vorhanden war, als bei vorheriger Stimulation mit Serotonin und EGF.

Ebenso verhielt es sich mit der alleinigen Stimulation durch Serotonin und EGF.



**Abbildung 13** Anzahl inaktiver Zellen im Mittel der Zelllinien Detroit-562, A431 und UMSCC-10B, mit und ohne Vorstimulation durch Serotonin und EGF und unter alleiniger chemotherapeutischer Intervention mittels Mab425. Bei mittels Ki-67 gefärbten Zellaustriichen wurde die Anzahl der nicht proliferierenden Zellen dreimal gezählt und der Mittelwert mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Es zeigte sich, dass eine Stimulation mit 10mM/ml Serotonin und 1µg/µl EGF vor einer Chemotherapie mit 10µg/ml Mab425 zu einer stärkeren Reduktion der inaktiven Zellen führte, als eine alleinige Chemotherapie mit Mab425. Dieser Effekt war über alle beobachteten Zelllinien feststellbar.

### 3.2.1.2 Western Blot bei mit Mab425 behandelten Zellen

Auch bei der Auswertung der Proteinaktivitäten, die durch Western Blot bestimmt wurden, ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen einer Vorstimulation mit Serotonin und EGF und der nachfolgenden Behandlung mit Mab425 und einer alleinigen chemotherapeutischen Intervention mit Mab425.

Bei der Beobachtung der einzelnen Zelllinien und deren Proteinaktivitäten konnten bei einzelnen Proteinen Abweichungen zur jeweiligen Kontrollmessung festgestellt werden, jedoch war kein eindeutiger Trend erkennbar.

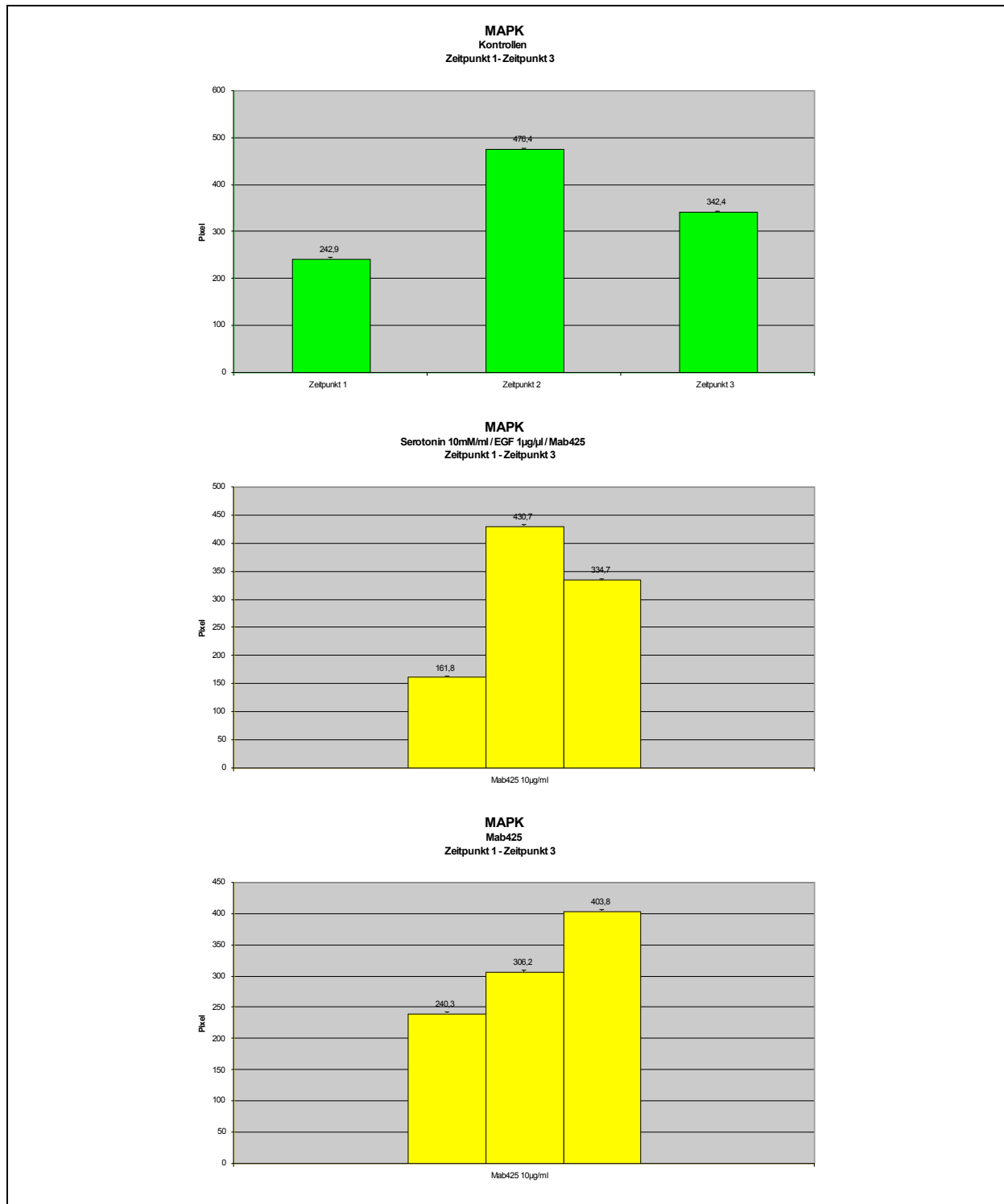
Bezugnehmend auf die Zelllinie A431 sollen beispielhaft Abweichungen bei der Aktivität der MAPK zur Kontrollgruppe besprochen werden. Es fand sich eine Reduktion des Aktivitätsgrades in den Proben, die eine Vorstimulation mit Serotonin und EGF und dann eine Chemotherapie mit Mab425 erhielten, sowie in der Gruppe, die ausschließlich chemotherapeutisch mit Mab425 behandelt wurde. Allerdings war kein eindeutiger Unterschied zwischen einer Vorstimulation und einer alleinigen Chemotherapie feststellbar. Der Aktivitätsgrad wurde über die Kodak DigitalScience™ Image Station cf 440 ausgewertet und in Pixeln gemessen (Abbildung 14).

Ähnliche Resultate bei der Untersuchung der Zelllinie A431 erhielten wir noch bei der Auswertung der Proteine pMAPK, Aktin, pAktin und pSTAT-3. Hier wurde jeweils eine Reduktion des Aktivitätsgrades bei alleiniger Chemotherapie mit Mab425 festgestellt.

Bei der Betrachtung der Zelllinien Detroit-562 und UMSCC-10B konnten ähnliche Abweichungen von der Kontrollgruppe festgestellt werden.

So fand sich bei der Auswertung der UMSCC-10B ein erniedrigter Aktivitätsgrad für pRaf, EGFR, pAktin, STAT-3 und pSTAT-3. Allerdings wieder ausschließlich bei alleiniger chemotherapeutischer Intervention mit Mab425.

Bei Betrachtung von Detroit-562 zeigte sich eine erniedrigte Aktivität für EGFR und pAktin.



**Abbildung 14 A431:** Darstellung des Aktivitätsgrades der MAPK in Kontrolle, Vorstimulation plus Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie mit Mab425. Es wurden die Western Blots mittels Kodak DigitalScience™ 1D Image Analysis Software ausgewertet und die Signalstärke der einzelnen Banden in Pixeln als Maß für die Aktivität der MAPK angegeben, sowie die Standardabweichung. Es zeigte sich, dass in Bezug auf die Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion des Aktivitätsgrades der MAPK bei den Proben mit einer Vorstimulation durch Serotonin und EGF und anschließender Chemotherapie durch Mab425 festzustellen war. Dies traf auch für eine alleinige Chemotherapie mit Mab425 zu. Ein Vergleich der vorstimulierten Proben mit denen, die eine alleinige Chemotherapie erhielten, erbrachte keinen deutlichen Unterschied.

### 3.2.1.3 Zellzählung bei mit ZD1839 behandelten Zellen

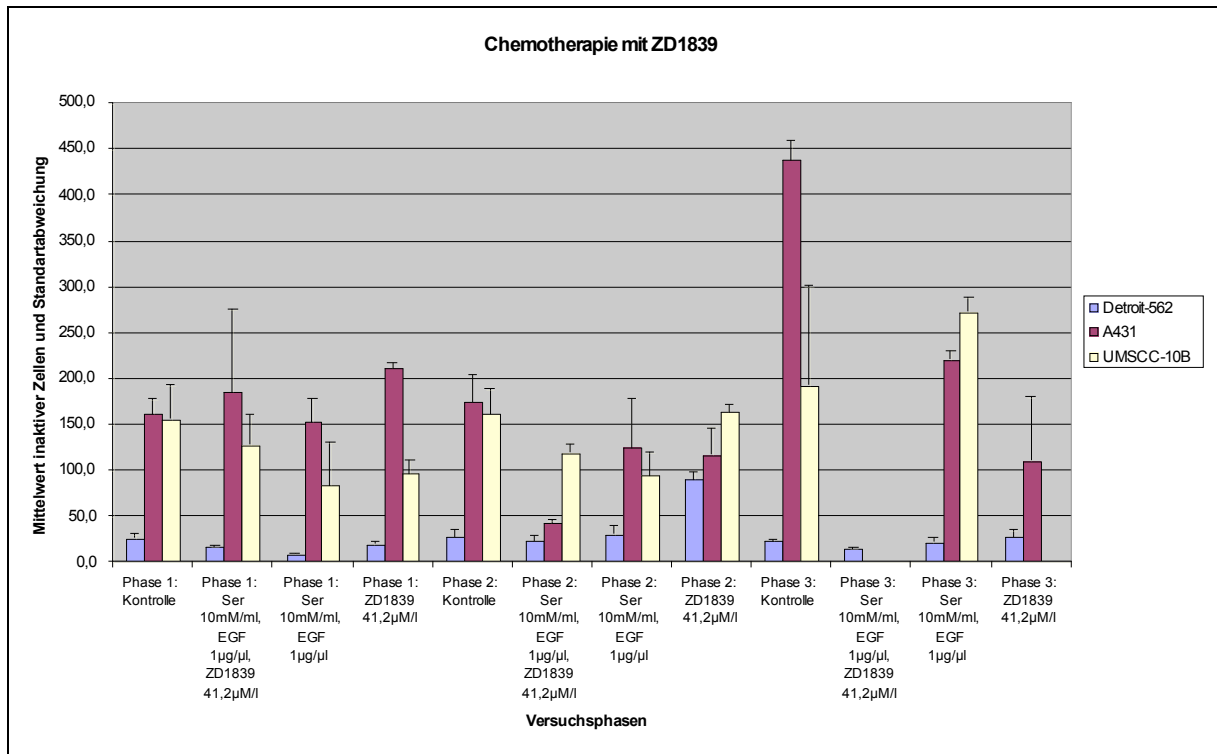
Die Auswertung der Zellzählung bei zwei Zelllinien (A431 und UMSCC-10B) gestaltete sich schwierig, da bei diesen Zelllinien nicht genügend Probenmaterial vorlag. Deshalb beschränkte sich die Auswertung hauptsächlich auf die Betrachtung der Detroit-562.

Hier konnte man erkennen, dass die Vorstimulation mit 10mM/ml Serotonin und 1µg/µl EGF bei folgender Behandlung mit 41,2µM/l ZD1839 einen leichten Effekt, beziehungsweise Vorteil gegenüber der alleinigen Behandlung mit ZD1839 hatte. Es zeigte sich, dass bei den vorstimulierten Proben die mittlere Anzahl der inaktiven Zellen leicht gegenüber der nur chemotherapeutisch behandelten Proben erniedrigt war.

So fanden sich 16,3 inaktive Zellen im Mittel in Phase 1 bei einer Vorstimulation mit anschließender Chemotherapie gegenüber 20,0 inaktiven Zellen im Mittel bei alleiniger Chemotherapie mit ZD1839. In Bezug auf die Kontrollgruppe (26,0 inaktive Zellen) zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der mittleren Anzahl der inaktiven Zellen.

In Phase 2 fanden sich 27,3 inaktive Zellen in der Kontrollgruppe. Bezogen darauf konnte man eine Reduktion der mittleren Zellanzahl der inaktiven Zellen bei vorstimulierten Zellen auf 23,3 feststellen. Die mittlere Anzahl der Zellen, die nur eine Chemotherapie mit ZD1839 erhielten war gegenüber Kontrollgruppe und Vorstimulation mit 90,0 inaktiven Zellen gesteigert.

In Phase 3 reduzierte sich die mittlere Anzahl der inaktiven Zellen, die eine Vorstimulation erhielten auf 15,0 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 23,7 in aktiven Zellen. Auch der Vergleich zur Monotherapie mit ZD1839 fiel zugunsten der Vorstimulation der Zellen aus. Bei einer Monotherapie fanden sich 27,5 inaktive Zellen im Mittel.



**Abbildung 15** Anzahl inaktiver Zellen im Mittel der Zelllinien Detroit-562, A431 und UMSCC-10B, mit und ohne Vorstimulation durch Serotonin und EGF und unter alleiniger chemotherapeutischer Intervention mittels ZD1839. Bei mittels Ki-67 gefärbten Zellaustriichen wurde die Anzahl der nicht proliferierenden Zellen dreimal gezählt und der Mittelwert mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Es wurden hauptsächlich die Proben der Detroit-562 bewertet, da bei den anderen Zelllinien nicht ausreichend Zellen zu bewerten waren. Es zeigte sich, dass eine Vorstimulation mit 1µg/µl EGF und 10mM/ml Serotonin zu einer leichten Reduktion der inaktiven Zellen führte. Dieser Effekt war im Vergleich zur Kontrollgruppe und im Vergleich zur Gruppe, die eine alleinige Chemotherapie mit 41,2µM/l ZD1839 erhielt über alle Versuchszeitpunkte festzustellen.

#### 3.2.1.4 Western Blot bei mit ZD1839 behandelten Zellen

Bei allen untersuchten Zelllinien zeigten sich leichte Effekte, die zu einer Reduktion der Aktivität der Proteine der Signaltransduktionskaskade führten. Eine deutliche Reduktion des Aktivitätsgrades konnte weder bei durch Vorstimulation durch Serotonin und EGF mit anschließender Chemotherapie behandelten Proben, noch bei den mit alleiniger Chemotherapie durch ZD1839 behandelten Proben festgestellt werden.

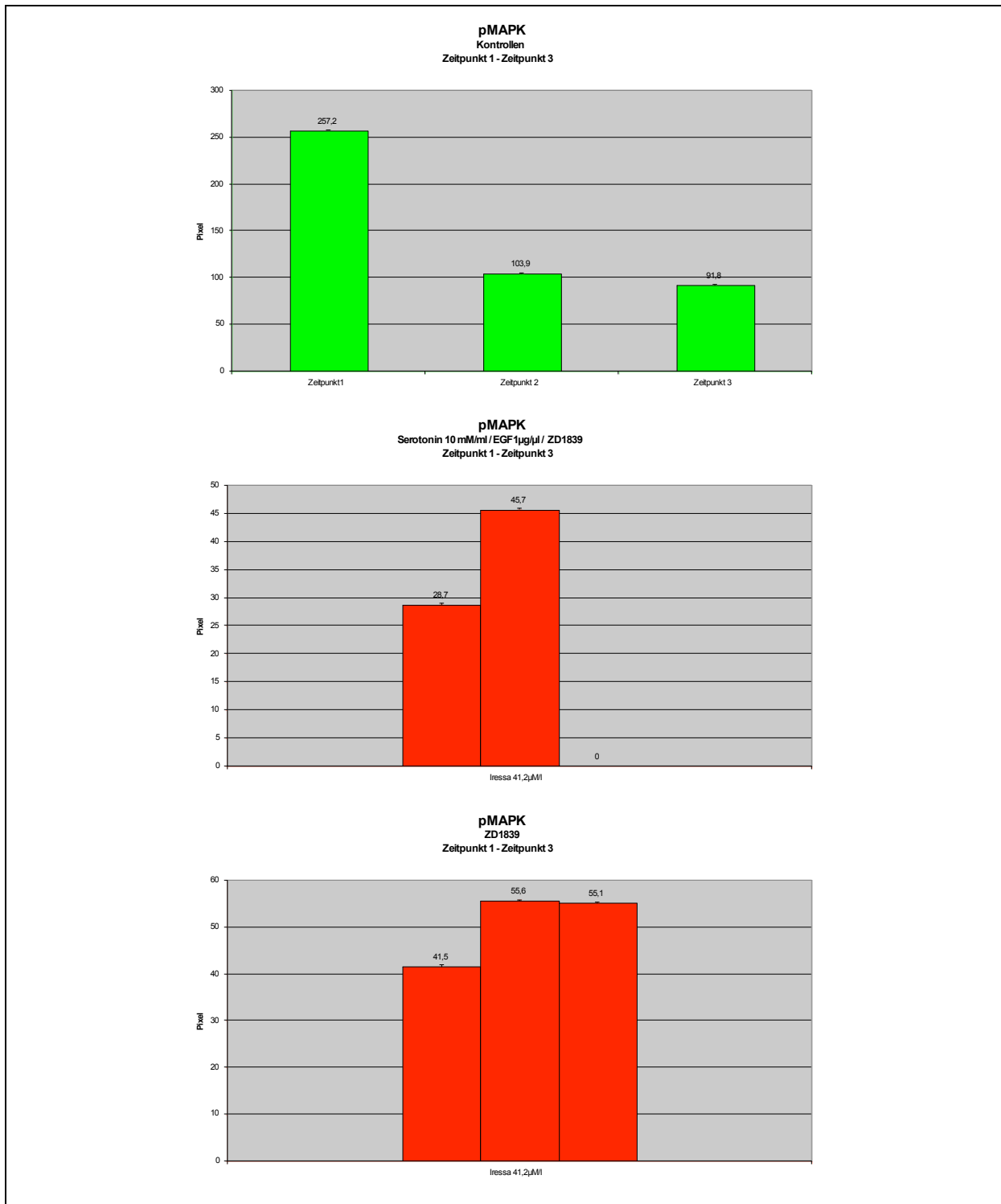
Beispielhaft soll anhand der Resultate von A431 die Aktivitätsminderung der pMAPK dargestellt werden. Es zeigte sich, dass eine Vorstimulation durch Serotonin und EGF mit anschließender Chemotherapie durch ZD1839 zu einer Reduktion des Aktivitätsgrades der pMAPK im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Ebenso verhielt es sich mit der Probe, die einer Monotherapie mit ZD1839 unterzogen wurde. Im Vergleich der beiden therapierten Proben zeigte sich, dass hier die Vorstimulation zu einem Effekt führte, der eine stärker ausgeprägte Reduktion der pMAPK im Vergleich zur Monotherapie mit ZD1839 mit sich brachte (Abbildung 16).

Vergleichbare Untersuchungsergebnisse bei Betrachtung der A431, die aber nicht so ausgeprägt waren, erhielten wir für die folgenden Proteine: pRaf, STAT-3 und pSTAT-3. Diese Proteine zeigten ebenfalls eine Reduktion ihres Aktivitätsgrades in Bezug auf die Kontrollgruppe, sowohl bei Vorstimulation mit Serotonin und EGF und anschließender Chemotherapie mit ZD1839, als auch bei Monotherapie mit ZD1839.

Bei der Zelllinie Detroit-562 waren diese Effekte für die Proteine pMAPK, pAktin und pSTAT-3 feststellbar.

Die Auswertung der Ergebnisse der Zelllinie UMSCC-10B erbrachte keine aussagekräftigen Resultate.





**Abbildung 16 A431:** Darstellung der Aktivität der pMAPK in Kontrolle, Vorstimulation plus Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie mit ZD1839. Es wurden die Western Blots mittels Kodak DigitalScience™ 1D Image Analysis Software ausgewertet und die Signalstärke der einzelnen Banden in Pixeln als Maß für die Aktivität der pMAPK angegeben, sowie die Standardabweichung. Es zeigte sich, dass eine Vorstimulation durch Serotonin und EGF mit anschließender Chemotherapie durch ZD1839 zu einer Reduktion des Aktivitätsgrades der pMAPK im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Ebenso verhielt es sich mit der Gruppe, die die Monotherapie mit ZD1839 erhielt.

### **3.2.2 Chemotherapie mit Docetaxel**

Es wurden auch hier ca. 2.500.000 Zellen von jeder Zelllinie, also Detroit-562, A431 und UMSCC-10B untersucht. Ein Teil der Proben wurde mit 10mM/ml Serotonin und 1µg/µl EGF für 2 Tage inkubiert, ehe sie einer chemotherapeutischen Intervention mittels 1nM/l Docetaxel unterzogen wurden, ein anderer erhielt ausschließlich eine Stimulation und ein dritter wurde nur mit Chemotherapie behandelt.

#### **3.2.2.1 Zellzählung bei mit Docetaxel behandelten Zellen**

Es zeigte sich bei der Kernfärbung gegen Ki-67, die den Proliferationsgrad der Zellen in aktiv und inaktiv unterscheiden ließ, dass bei allen 3 untersuchten Zelllinien die Anzahl der G0-Phase-Zellen signifikant abgenommen hatte.

Besonders der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die erst eine Vorstimulation mit Serotonin und EGF erhielt und dann chemotherapeutisch mit Docetaxel behandelt wurde, zeigte, dass eine Vorstimulation eine deutliche Reduktion der G0-Phase-Zellen mit sich brachte. Aber auch im Vergleich zu der ausschließlich mit Docetaxel behandelten Gruppe, reduzierte sich die Anzahl der G0-Phase-Zellen bei Vorstimulation deutlich ( $p < 0,04$ ).

Dieser Effekt, der durch die Vorstimulation mit Serotonin und EGF hervorgerufen wurde, war bei allen untersuchten Zelllinien zu beobachten. Lediglich die Zunahme der Proliferation variierte zwischen den einzelnen Zelllinien (Abbildung 17).

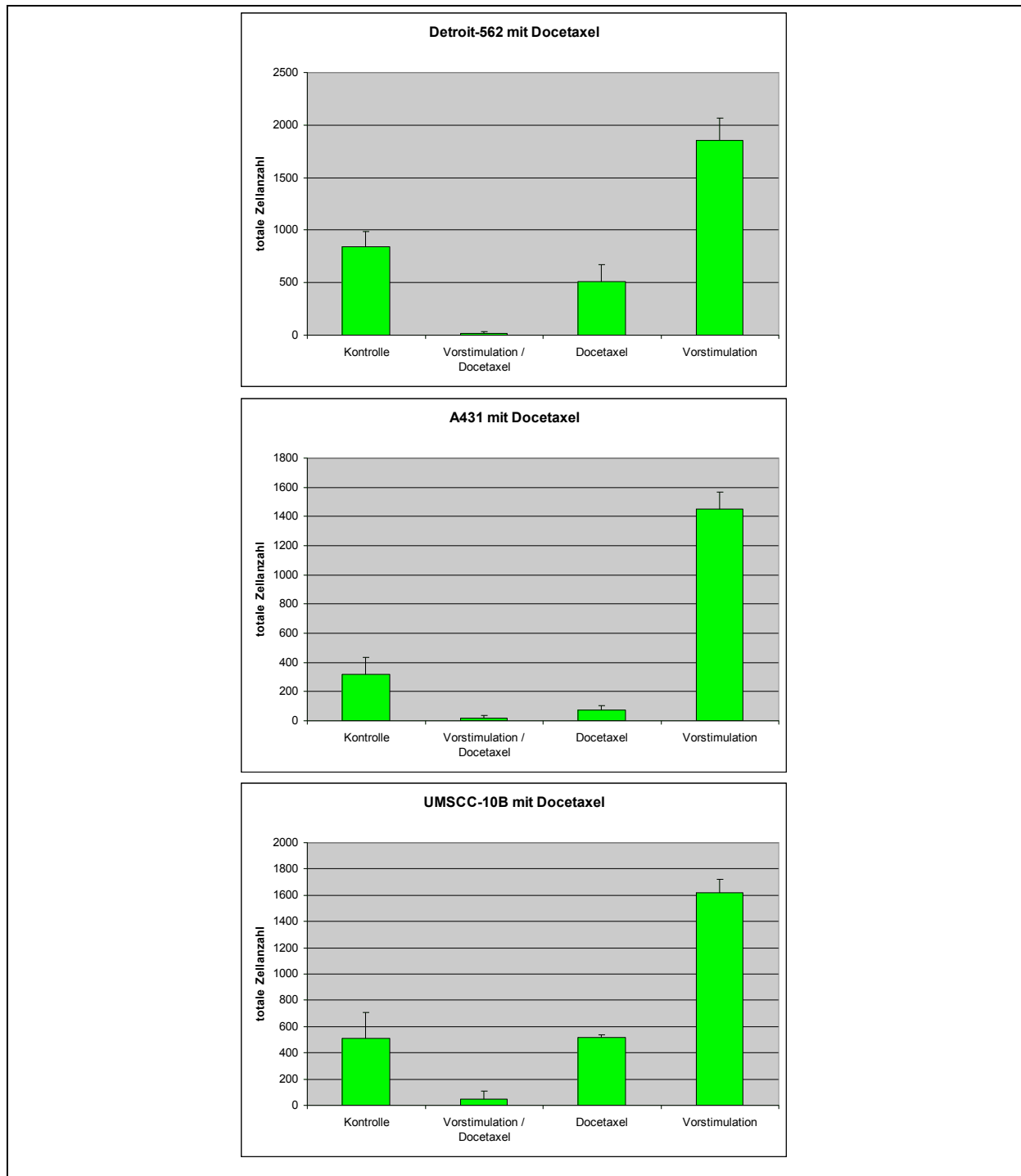


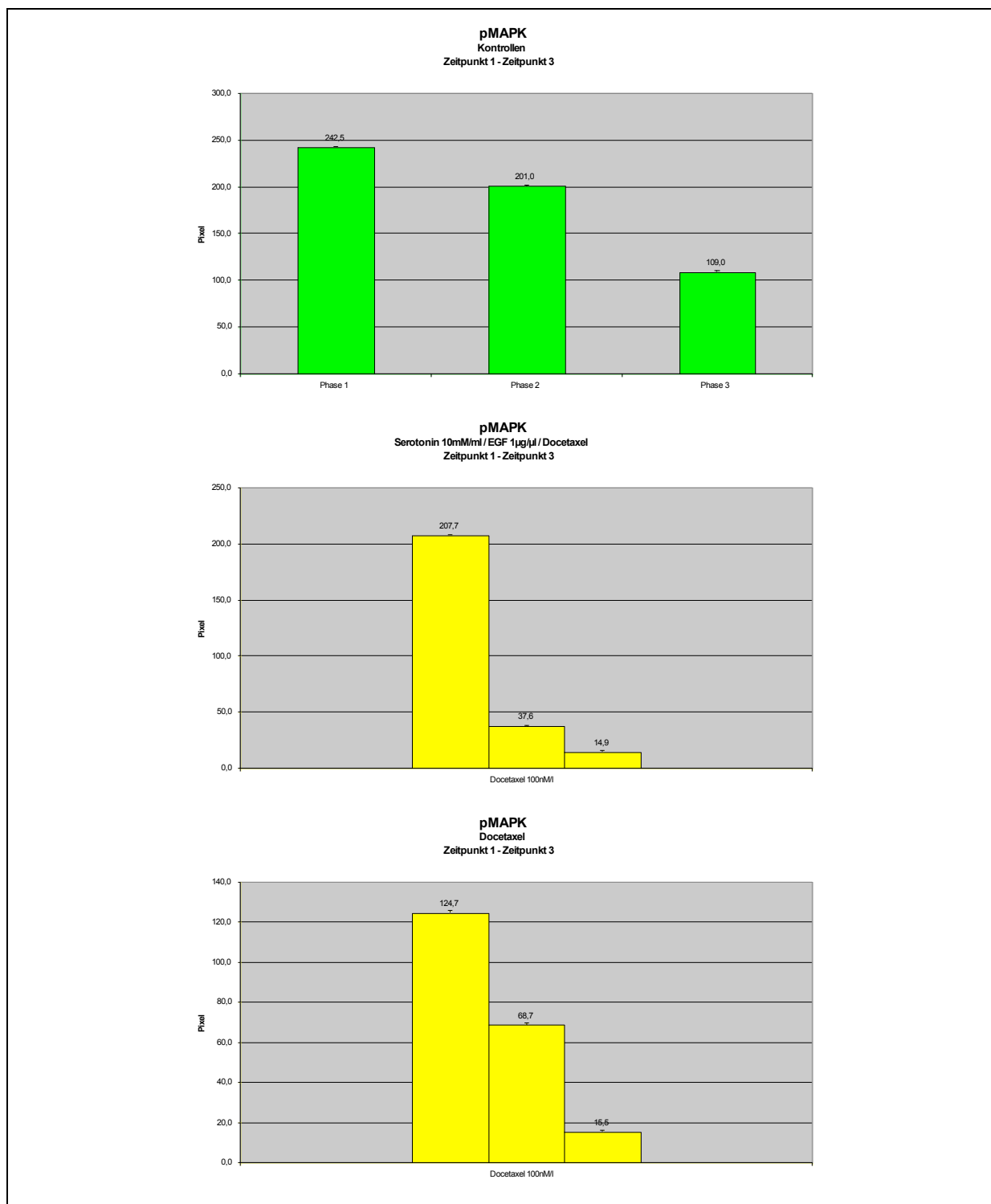
Abbildung 17 Darstellung aller untersuchter Zelllinien (Detroit-562, A431 und UMSCC-10B) und deren totaler Zellanzahl in der Kontrollgruppe, der Gruppe, die eine Vorstimulation mit Serotonin und EGF vor einer chemotherapeutischen Intervention mit Docetaxel erhielt, der Gruppe, die eine Monotherapie mit Docetaxel erhielt und der Gruppe, die nur mit Serotonin und EGF vorstimuliert wurde. Zellen der Linien Detroit-562, A431 und UMSCC-10B wurden mit Serotonin (10nM/ml) und EGF (1µg/µl) inkubiert. Nach Zugabe von 1nM Docetaxel zeigte sich, dass die vorstimulierte Gruppe eine signifikante Reduktion der G0-Phase-Zellen aufwies ( $p < 0,04$ ). Die Anzahl der stimulierten Zellen ohne Docetaxelbehandlung war bei UMSCC-10B und A431 höher, als bei Detroit-562, wenn man dies mit der Kontrollgruppe verglich. Die Abbildung gibt die Mittelwerte der absoluten Zellzählung und den Standardfehler wieder.

### **3.2.2.2 Western Blot bei mit Docetaxel behandelten Zellen**

Es zeigten sich bei allen untersuchten Zelllinien leichte Effekte auf die Aktivität einzelner Proteine der Signaltransduktionskaskade.

Beispielhaft sollen anhand der Aktivität der pMAPK die Effekte von einer chemotherapeutischen Intervention mittels Docetaxel gezeigt werden.

Es zeigte sich, dass eine Vorstimulation mit Serotonin und EGF mit anschließender Chemotherapie durch Docetaxel zu einer Reduktion des Aktivitätsgrades der pMAPK im Vergleich zur Kontrollgruppe erbrachte. Auch im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie mit Docetaxel führt eine Vorstimulation zu einer Reduktion der Aktivität der pMAPK (Abbildung 18).



**Abbildung 18 UMSCC-10B: Darstellung der Aktivität der pMAPK in Kontrolle, Vorstimulation plus Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie mit Docetaxel. Es wurden die Western Blots mittels Kodak DigitalScience™ 1D Image Analysis Software ausgewertet und die Signalstärke der einzelnen Banden in Pixeln als Maß für die Aktivität der pMAPK angegeben, sowie die Standardabweichung. Es zeigte sich, dass eine Stimulation mit Serotonin und EGF vor einer Chemotherapie mit Docetaxel zu einer Reduktion der Aktivität der pMAPK im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Gleiches galt auch für eine alleinige Chemotherapie mit Docetaxel.**

### 3.2.3 Chemotherapie mit Cisplatin

Wie bei allen anderen Chemotherapeutika untersuchten wir bei der Chemotherapie mittels Cisplatin ebenfalls eine Zellaussaat jeder Zelllinie (Detroit-562, A431 und UMSCC-10B) mit anfangs ca. 2.500.000 Zellen pro Kulturflasche. Diese wurden jeweils mit 10nM/ml Serotonin und 1µg/µl EGF für 2 Tage vorstimuliert, ehe sie einer Chemotherapie mit 5,15µM/l Cisplatin behandelt. Eine weitere Gruppe wurde nur einer Vorstimulation unterzogen und eine Dritte ausschließlich chemotherapiert.

#### 3.2.3.1 Zellzählung bei mit Cisplatin behandelten Zellen

Es wurden Zellen aller Zelllinien mit Ki-67-Antigen angefärbt und die Anzahl der G0-Phase-Zellen ausgewertet. Hierbei zeigt sich, dass bei allen untersuchten Zelllinien die Anzahl der inaktiven Zellen durch eine Vorstimulation mittels Serotonin und EGF signifikant abgenommen hat.

Im Besonderen erbrachte der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Probe, die eine Vorstimulation mittels Serotonin und EGF erhielt, eine signifikante Reduktion der Anzahl der G0-Phase-Zellen ( $p < 0,04$ ). Aber auch im Vergleich zu der Gruppe, die ausschließlich chemotherapeutisch mit Cisplatin behandelt wurde, zeigte sich ein Vorteil der Vorstimulation. Hier war ebenfalls eine stärkere Abnahme der Anzahl inaktiver Zellen zu beobachten, als bei alleiniger Chemotherapie.

Diese Effekte auf die Proliferation und waren über alle untersuchten Zelllinien zu beobachten. Es zeigte sich ebenfalls lediglich eine Varianz in der Intensität der Proliferation zwischen den untersuchten Zelllinien (Abbildung 19).

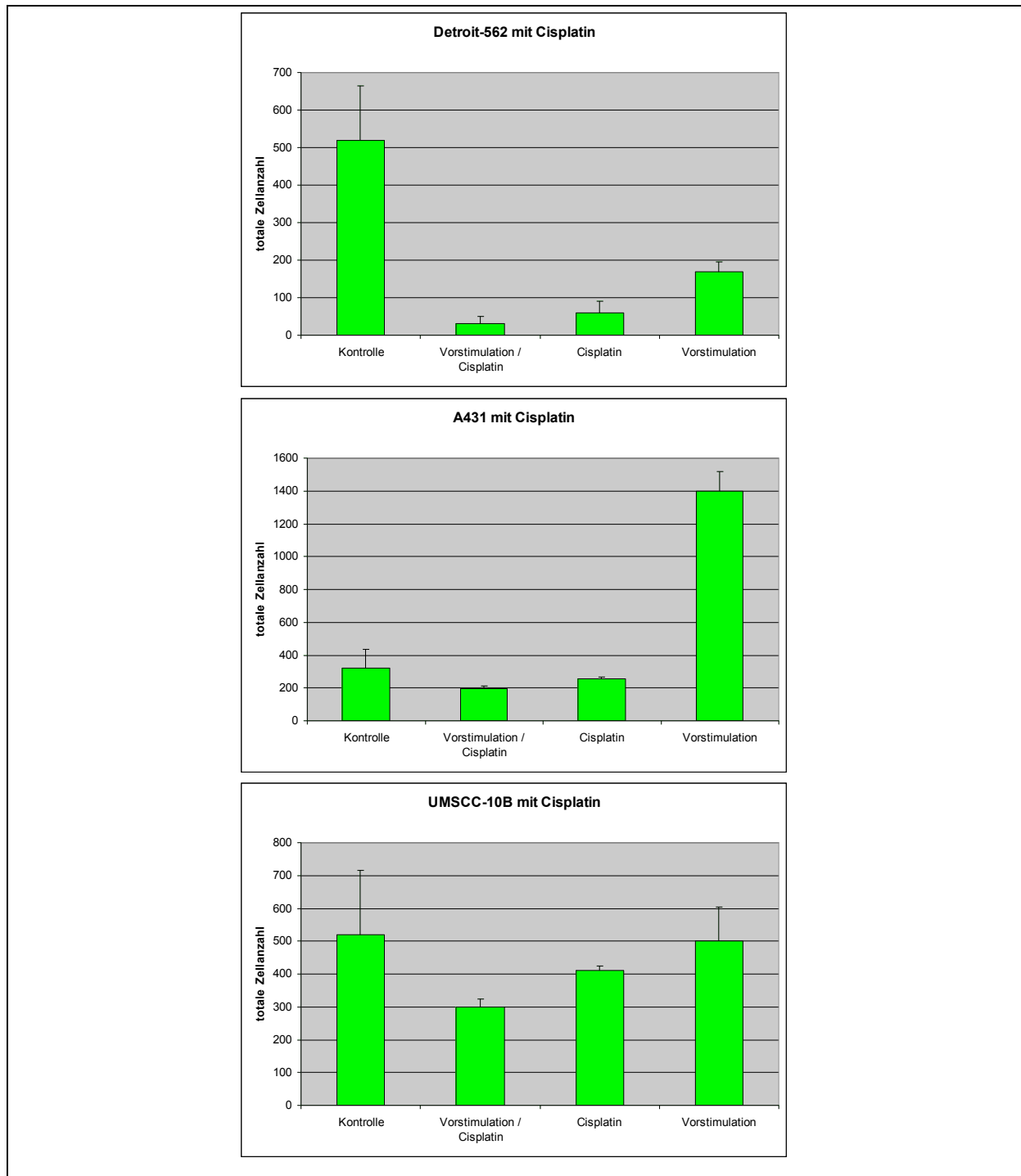


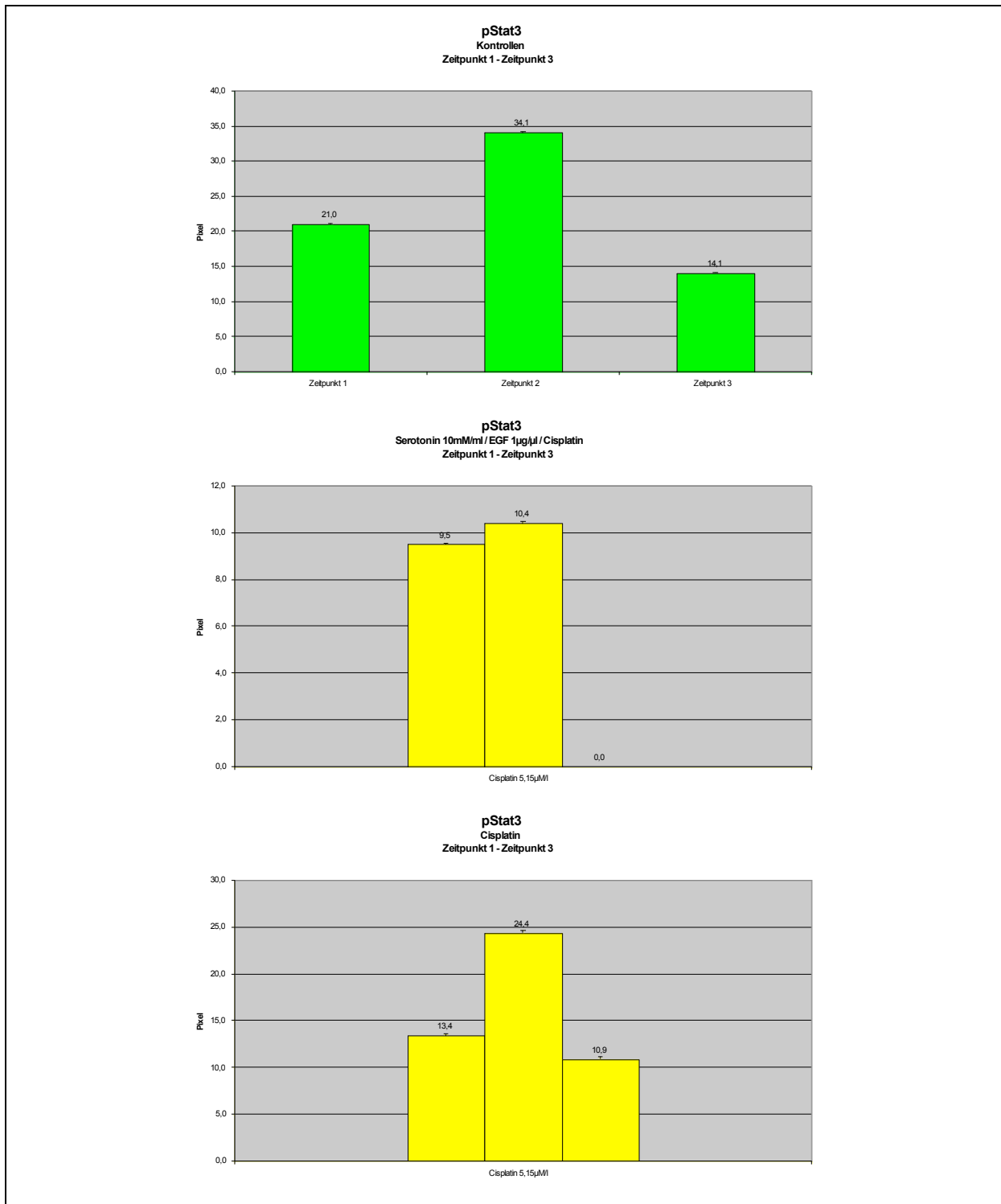
Abbildung 19 Darstellung aller untersuchter Zelllinien (Detroit-562, A431 und UMSCC-10B) und deren totaler Zellanzahl in der Kontrollgruppe, der Gruppe, die eine Vorstimulation mit Serotonin und EGF vor einer chemotherapeutischen Intervention mit Cisplatin erhielt, der Gruppe, die eine Monotherapie mit Cisplatin erhielt und der Gruppe, die nur mit Serotonin und EGF vorstimuliert wurde. Zellen der Linien Detroit-562, A431 und UMSCC-10B wurden mit Serotonin (10mM/ml) und EGF (1µg/µl) inkubiert. Nach Zugabe von 5,15µM/l Cisplatin zeigte sich, dass die vorstimulierte Gruppe eine signifikante Reduktion der G0-Phase-Zellen aufwies ( $p < 0,04$ ). Die Anzahl der stimulierten Zellen ohne Cisplatinbehandlung war bei UMSCC-10B und A431 höher, als bei Detroit-562, wenn man dies mit der Kontrollgruppe verglich. Die Abbildung gibt die Mittelwerte der absoluten Zellzählung und den Standardfehler wieder.

### **3.2.3.2 Western Blot bei mit Cisplatin behandelten Zellen**

Im Rahmen der Proteinanalyse der Signaltransduktionskaskade, die per EGFR vermittelt wird, zeigte sich eine Reduktion der Proteinaktivitäten einzelner Proteine, die beispielhaft an der Aktivität von pSTAT-3 bei der untersuchten Zelllinie UMSCC-10B gezeigt werden soll.

Hier zeigt sich, dass eine Vorstimulation mit Serotonin und EGF und anschließende Chemotherapie mit Cisplatin zu einer stärkeren Reduktion der Aktivität von pSTAT-3 im Vergleich zur Kontrolle führte, als eine alleinige Chemotherapie mit Cisplatin. Diese erbrachte zwar ebenfalls eine Reduktion der Proteinaktivität. Der Vorteil lag aber sichtlich auf Seiten der vorstimulierten Gruppe (Abbildung 20).





**Abbildung 20 UMSSC-10B:** Darstellung der Aktivität der pSTAT-3 in Kontrolle, Vorstimulation plus Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie mit Cisplatin. Es wurden die Western Blots mittels Kodak DigitalScience™ 1D Image Analysis Software ausgewertet und die Signalstärke der einzelnen Banden in Pixeln als Maß für die Aktivität der pMAPK angegeben, sowie die Standardabweichung. Es zeigte sich, dass eine Stimulation mit Serotonin und EGF vor einer Chemotherapie mit Cisplatin zu einer Reduktion der Aktivität der pMAPK im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Gleiches galt auch für eine alleinige Chemotherapie mit Cisplatin.

## 4 Diskussion

Es hat sich gezeigt, dass das Hauptproblem der Behandlung von SCCHN die hohe Rezidivwahrscheinlichkeit dieser Tumoren ist. Ein sehr hoher Anteil an Patienten (ca.60%), die an einem höheren Tumorstadium leiden (Stadium III oder IV), erlebt in einem Zeitraum von ca. 36 Monaten das Auftreten eines Rezidivtumors. (Shah, Sha-ha et al. 1976)

Da die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Tumoren mit der dauerhaften Reduktion der Tumorzellen oder einem krankheitsfreien Zeitraum korreliert, hat sich die moderne Chemotherapie das Ziel gesetzt, diesen Zeitraum zu verlängern.

### 4.1.1 Chemotherapeutische Intervention bei SCCHN

Eine Induktionschemotherapie findet ihren Einsatz bei fortgeschrittenen Primärtumoren, rezidivierende und metastasierende Tumoren werden in der Regel adjuvant oder palliativ chemotherapeutisch behandelt. Besonders der Einsatz von auf Cisplatin basierenden Protokollen wurde bisher propagiert. Sowohl der Einsatz von Cisplatin als Monotherapie, als auch eine Kombination mit anderen Chemotherapeutika, hier ist besonders 5-FU (5-Fluoruracil) zu nennen, galt bisher als Therapiemöglichkeit der Wahl bei der chemotherapeutischen Intervention von SCCHN.

Diese klassischen Ansätze in der Induktionschemotherapie von SCCHN wurden in der letzten Zeit durch die Integration von neueren Substanzen, wie den monoklonalen Antikörpern gegen EGFR oder den Taxanen ergänzt. Man hat herausgefunden, dass auch die Unterbindung einer über EGFR vermittelten Signaltransduktion oder die Mitosehemmung durch Taxane zu einer Reduktion der Zellzahl führen kann.

Es hat sich gezeigt, dass der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen EGFR in Kombination mit der klassischen Chemotherapie viel versprechende Ansätze mit sich bringt (Bourhis 2005). Besonders die Kombination von Cisplatin mit monoklonalen Antikörpern gegen EGFR erbrachte in einigen Phase-I-II-Studien gute Ergebnisse (Baselga, Trigo et al. 2005) (Herbst, Arquette et al. 2005). Aber auch der alleinigen Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen EGFR wird in einigen Studien eine wegweisende Rolle zugeordnet.

Die Integration von Taxanen in der Chemotherapie spielt eine zunehmende Rolle (Devriendt and Klastersky 1997) (Schoffski, Weihkopf et al. 1998). Es konnte gezeigt

werden, dass der Einsatz als Monotherapie und in Kombination mit Cisplatin und 5-FU zu beachtlichen Ergebnissen in der Therapie von rezidivierenden SCCHN führte (Janinis, Papadakou et al. 2000). Im Rahmen der Induktionschemotherapie konnte außerdem gezeigt werden, dass Docetaxel in Kombination mit Cisplatin und 5-FU einen deutlichen therapeutischen Effekt erzielen kann (Posner 2001; Posner, Glisson et al. 2001; Haddad, Weinstein et al. 2004; Posner, Haddad et al. 2004)

Obwohl sich bei einigen Patienten nach einer Therapie eine komplette Remission zeigte, kommt es in einer Vielzahl an Fällen zu einem erneuten Auftreten des Tumors oder von Metastasen in einem Zeitraum von 2 Jahren nach Abschluss der Chemo- oder Radiochemotherapie.

Die Ursachen für das Auftreten von Metastasen oder Rezidiven nach einem solchen Zeitraum können darin begründet liegen, dass es einen Anteil an Tumorzellen gibt, der sich einer chemotherapeutischen Intervention durch Inaktivität (G0-Phase-Zellen) entzieht oder durch das erneute Auftreten von Tumorzellen in der gleichen Region. Die spätere Aktivierung von G0-Phase-Zellen legt den Schluss nahe, dass eine vorhergehende chemotherapeutische Intervention nicht ausreichend gewesen ist, bedingt durch eine kritische Anzahl an Zellen, die sich in der G0-Phase befinden. Wir nahmen deshalb an, dass diese Zellen nicht sensibel für eine Chemotherapie oder eine Strahlentherapie gewesen sind.

#### **4.1.2 Sensibilisierung durch Wachstumsfaktoren**

An leukämischen Zellen konnte sehr eindrucksvoll demonstriert werden, dass deren Unsensibilität gegenüber einer chemotherapeutischen oder einer immunotherapeutischen Intervention aller Wahrscheinlichkeit nach mit dem Verbleiben der Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus zusammenhängt (Jedema, Barge et al. 2003). Daraus konnte man schließen, dass eine Stimulation mittels Wachstumsfaktoren die Zellen aus der G0-Phase befreit, sie in eine proliferative Phase des Zellzyklus überführt und sie dadurch eine höhere Sensibilität gegenüber einer Therapie erlangen können (Jedema, Barge et al. 2004).

Dies stellt eine bisher nicht vorhandene Neuerung in der chemotherapeutischen Intervention dar, da bis dato viel darüber diskutiert wurde, Tumorzellen in der G0-Phase des Zellzyklus zu arretieren (Wang, Pan et al. 2005) (Hashimoto, He et al. 2004) (Polek, Stewart et al. 2003) (Liu, Wang et al. 2003) (Denkert, Furstenberg et al.

2003). Das Problem dabei ist, dass dieser Teil der Zellen in der Tumormasse verbleibt. Er ist zwar nicht aktiv und partizipiert nicht an den Teilungsvorgängen, kann aber unter bestimmten, für die Zellen günstigen Umständen, reaktiviert werden und führt dann zu einer erneuten Progression und Proliferation des Tumors (Clark, Perman et al. 2002) (Russo, Ottoboni et al. 2001) (Kuroki, Hirokawa et al. 1996) (Mullen, Scott et al. 1991). Es hat sich bei Untersuchungen an leukämischen Zellen gezeigt, dass die Anzahl der vorhandenen G0-Phase-Zellen das Ansprechen des Tumors auf eine chemotherapeutische Intervention mitbestimmt (Kamikubo, Ogata et al. 2000). Dies bedeutet, dass eine Reduktion des Anteils an G0-Phase-Zellen mit einem höheren Ansprechen des Tumors auf eine Chemotherapie einhergeht.

Die Reintegration von G0-Phase-Zellen in die proliferativen Phasen des Zellzyklus geht mit einer gesteigerten Expression von Proteinen der Signaltransduktionskaskade einher, die man als Antigene verstehen kann und mittels Proteinmarkern detektieren kann (Bolton, Freeman et al. 1994). Es ist außerdem bekannt, dass SCCHN Wachstumsfaktoren benötigen, um proliferieren zu können (Rubin Grandis, Melhem et al. 1998).

Aus diesem Grund wurde im Rahmen von unseren Stimulationsversuchen untersucht, ob Wachstumsfaktoren in der Lage sind, eine Reaktivierung von G0-Phase-Zellen zu bewerkstelligen. Wir konnten zeigen, dass dies mit einer Kombination von Serotonin und EGF sehr gut möglich ist, da hier die höchste Anzahl an Zellen in die proliferativen Phasen des Zellzyklus überführt werden konnten (Abbildung 10).

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, dass die Effekte, die eine Stimulation mit Serotonin und EGF mit sich brachten zu einer signifikanten Steigerung der proliferierenden Zellen führten. Dieser Effekt konnte über alle untersuchten Zelllinien beobachtet werden, also bei Detroit-562, A431 und UMSSC-10B.

Dazu kam, dass sich nach Stimulation durch die Therapie mit Docetaxel und Cisplatin signifikant höhere Reduktionen der Zellanzahl nachweisen ließen als ohne Stimulation. Dies berechtigt zu der Annahme, dass eine chemotherapeutische Intervention gut durch eine vorherige Stimulation mit Wachstumsfaktoren in ihrer Effektivität gesteigert werden kann. Da hier die Anzahl an G0-Phase-Zellen deutlich reduziert wird und dadurch die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass „schlummernde“ Tumorzellen durch für sie günstige Bedingungen aktiviert werden könnten.

Unsere Untersuchungen zeigten zum ersten Mal, dass es auch bei SCCHN möglich ist, über eine gezielte Stimulation mittels Zytokinen zu einer Steigerung der proliferierenden Zellen zu kommen.

Voraussetzend, dass sich ein großer Teil der Zellen in einer Tumorzellpopulation zu Beginn einer Chemotherapie in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden, könnte eine Stimulation mittels Serotonin und EGF zu einer stärkeren Synchronisation der Tumorzellen im Zellzyklus führen. Wir schlossen daraus, dass sich dadurch die Effektivität einer chemotherapeutischen Intervention erhöhen könnte. Dies stellten wir signifikant bei der Behandlung der Tumorzellen mit Docetaxel und Cisplatin fest.

Interessanterweise wurde diese Steigerung der Effektivität besonders bei zytotoxischen Chemotherapeutika, wie Docetaxel und Cisplatin festgestellt. Dies legt den Schluss nahe, dass eine alleinige Intervention auf Ebene der Modulation der EGFR-Signaltransduktionskaskade, wie zum Beispiel mit ZD1839 oder Mab425 nicht für eine suffiziente Reduktion der Tumorzellen ausreicht. Hier wäre zu überlegen, wie dies in einigen Studien beschrieben wurde, ob eine Kombination von zytotoxischen Substanzen wie Cisplatin oder Docetaxel in Kombination mit Zytostatika wie ZD1839 oder Mab425 von Vorteil für eine suffizientere Therapie sein könnte.

#### **4.1.3 Ausblick**

Die von uns durchgeführten Untersuchungen belegen zum ersten Mal bei SCCHN die Möglichkeit der Sensibilisierung der Tumorzellen für eine chemotherapeutische Intervention durch Wachstumsfaktoren. Ein solcher Synchronisationseffekt könnte einen entscheidenden Schritt für den Wirkungsgrad der Chemotherapie bei Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes bedeuten.

Als zukunftsweisenden Aspekt in der modernen Chemotherapie erscheint mir auch eine Chemotherapeutikaapplikation durch Immunoliposomen, wie sie in Untersuchungen an Tumorzellen, die den EGFR überexprimieren durchgeführt wurden. Hierbei wurden Immunoliposomen gegen den EGFR mit Chemotherapeutika beladen, die dann über diese Rezeptoren in die Zellen internalisiert wurden. Dadurch wurde es möglich, eine höhere Konzentration an Chemotherapie in die Zellen zu transportieren, was zu einer Steigerung der Effektivität der chemotherapeutischen Intervention führte (Mamot, Drummond et al. 2005; Mamot, Ritschard et al. 2006). Vielleicht ergibt sich daraus eines Tages eine Möglichkeit die Sensibilisierung von Tumorzellen mit

der gezielten hochdosierten Therapieoption durch Immunliposomen zu kombinieren und dadurch die Effektivität einer Chemotherapie auch von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich entscheidend zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes (SCCHN) sind Karzinome, die in den westlichen Industrienationen mit dem sechsten Rang in den Tumorstatistiken recht häufig sind. Ihre Inzidenz ist positiv mit einem erhöhten Tabak- und Alkoholkonsum und dem männlichen Geschlecht korreliert. Die Standardtherapie besteht in der Regel in einer operativen Sanierung und einer adjuvanten Radio- beziehungsweise Radio-Chemotherapie. Eine Induktionschemotherapie verspricht fortgeschrittene Primärtumoren und Tumoren vor einer operativen Intervention zu verkleinern. Jedoch besteht hierbei immer noch das Problem der hohen Rezidivfreundlichkeit dieser Tumoren, die wahrscheinlich mit der hohen Anzahl an G0-Phase-Zellen korreliert ist.

Die vorliegende Arbeit hat die Frage untersucht, ob es möglich ist mit einer vorgeschalteten Stimulation durch Wachstumsfaktoren die Anzahl der G0-Phase-Zellen signifikant zu reduzieren und dadurch die gesamte Population der Tumorzellen sensibler für eine chemotherapeutische Intervention zu machen. Hierbei wurden besonders die Wachstumsfaktoren EGF und Serotonin als Stimulus verwendet. Die untersuchten Chemotherapeutika waren Mab425 und ZD1839, die die Signaltransduktion über einen EGFR-vermittelten Weg blockieren, sowie Docetaxel und Cisplatin, die als zytotoxische Substanzen wirksam sind.

Die Untersuchungen wurden *in vitro* an drei Zelllinien durchgeführt. Detroit-562 und A431 bezogen wir von ATCC. Die Zelllinie UMSCC-10B wurde uns freundlicherweise von Thomas Carey von der University of Michigan zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen von Sondierungsversuchen stimulierten die Zellen mit IL-6, Serotonin, EGF und GCSF und fanden mit Hilfe der FACS-Analyse heraus, dass eine Kombination von EGF und Serotonin zur am stärksten ausgeprägten Stimulation der von uns untersuchten Zellen führte.

In einem dreiphasigen Versuchsablauf wurden vier verschiedene Proben Gruppen untersucht. Zum einen eine Kontrollgruppe, die weder stimuliert noch chemotherapiert wurde. Eine Gruppe, die vor einer chemotherapeutischen Intervention mit Serotonin und EGF stimuliert wurde. Eine weitere Gruppe, die ausschließlich mit Serotonin und EGF stimuliert wurde und eine Gruppe, die nur eine Chemotherapie erhielt.

Nach der Kultivierung der entsprechenden Proben, wurden die Zellen geerntet und zur Weiterverarbeitung vorbereitet. Es wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse die Aktivität der Proteine untersucht, die an der über EGFR vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. Dazu wurden Antikörper gegen Proteine der Signaltransduktion eingesetzt, die dann mit Hilfe von zweiten Antikörpern erkannt wurden. Zum anderen wurden immunhistochemische Zellausstriche angefertigt mit einer Antikörperfärbung gegen das Kernprotein Ki-67, die uns zwischen proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen unterscheiden ließ. Es erfolgte eine Auswertung der Gesamtzellanzahl bezogen auf die Reduktion der G0-Phase-Zellen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests und des Wilcoxon-Tests. Hierbei lag das Signifikanzniveau bei 5%.

Als Ergebnis kann man festhalten, dass eine signifikante Reduktion der Anzahl an G0-Phase-Zellen bei einer Vorstimulation und anschließender Chemotherapie durch Docetaxel oder Cisplatin zu beobachten war. Eine chemotherapeutische Intervention durch Mab425 und ZD1839 führte zwar zu einer Reduktion der Zellanzahl, aber nicht zu vergleichbar signifikanten Ergebnissen wie bei einer Intervention mit Docetaxel oder Cisplatin. Hieraus lässt sich der Schluss ableiten, dass eine chemotherapeutische Intervention auf Basis einer Blockade der durch EGFR vermittelten Signaltransduktion nicht ausreichend ist, es also einer zytotoxischen Komponente bedarf, um die Gesamtzellzahl signifikant zu reduzieren.

Trotzdem nicht bei allen untersuchten Chemotherapeutika eine signifikante Reduktion der G0-Phase-Zellen beobachtet werden konnte, zeigten unsere Untersuchungen zum ersten Mal, dass durch eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren vor einer chemotherapeutischen Intervention, die Sensibilität der Tumorzellen bei SCCHN für eine Chemotherapie durch eine Reduktion der G0-Phase-Zellen erhöht wird.



## 6 Summary

Squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) is a cancer which is widespread in the industrialised countries of the world. The incidence is positively correlated with the abnormal use and consumption of tobacco and/or alcohol and the male gender.

The treatment of choice is to do surgery and afterwards an adjuvant radio- or radio-chemotherapy. The aim of a first line chemotherapy (induction chemotherapy) is to minimize the consisting tumour masses before a surgical intervention is done. Nevertheless one of the major problems concerning the response of SCCHN to chemotherapy is the high percentage of resting cells (G0-phase cells) being resistant to chemotherapy.

To overcome this problem we have investigated the capacity of several cytokines, namely Serotonin and EGF to transfer resting cells into an active state of the cell cycle and progress to chemosensitive phases (S, M-phase). Chemotherapeutical agents we used included Mab425, ZD1839, Docetaxel and Cisplatin. We investigated with Mab425 and ZD1839 the blocking of an EGFR-controlled pathway of the cell activation. Docetaxel and Cisplatin are cytotoxic agents.

All our investigations were done with SCCHN cells. Detroit-562 and A431 are cells we received from ATCC. Thomas Carey of the University of Michigan kindly provided UMSCC-10B.

IL-6, Serotonin, EGF and GCSF were used to stimulate G0-phase SCCHN cells for re-entry in the cell cycle to enhance the response to chemotherapeutical intervention. The proportion of G0-phase cells was detected through multicolour FACS analysis and Ki-67 staining. We found that the most effective combination was Serotonin and EGF.

We cultivated four different groups of samples. One was the control group which received no treatment. One of the groups received stimulation with Serotonin and EGF and afterwards chemotherapeutical intervention. Another group only received stimulation with Serotonin and EGF and one group only received chemotherapeutical intervention.

After cultivation, cells were harvested and prepared for either Western-Blot analysis

---

or Ki-67 staining. With Western-Blot analysis we investigated the proportion of activated proteins in the EGFR transduced pathway of cell activation. Ki-67 staining helped us to divide between activated and resting cells. We analyzed the total cell amount compared to the reduction of G0-phase cells.

For statistical analysis we used the Mann-Whitney-U-test and Wilcoxon-test in SPSS (version 9.0). The significance was 5%.

Our investigations demonstrate for the first time that sensitizing G0 phase SCCHN cells for chemotherapeutical treatment is possible by prestimulation with target cytokines. A prestimulation before a chemotherapeutical intervention with Docetaxel or Cisplatin led to significant reduction of G0 phase cells ( $p < 0,04$ ). This effect could also be seen by chemotherapy with Mab425 or ZD1839 but it was not as significant as it was with Docetaxel or Cisplatin. Concluding this we could see that a cytotoxic mechanism is necessary to reduce the total amount of tumour cells.

## 7 Literaturverzeichnis

Bach, B. A., W. A. Knape, et al. (1991). "Improved sensitivity and resolution in the flow cytometric DNA analysis of human solid tumor specimens. Use of in vitro fine-needle aspiration and uniform staining reagents." Am J Clin Pathol **96**(5): 615-27.

Banes, A. K., S. M. Shaw, et al. (2005). "Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin." Am J Physiol Cell Physiol **288**(4): C805-12.

Baselga, J., J. M. Trigo, et al. (2005). "Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck." J Clin Oncol **23**(24): 5568-77.

Berclaz, G., H. J. Altermatt, et al. (2001). "EGFR dependent expression of STAT3 (but not STAT1) in breast cancer." Int J Oncol **19**(6): 1155-60.

Bolton, W. E., J. W. Freeman, et al. (1994). "Expression of proliferation-associated antigens (PCNA, p120, p145) during the reentry of G0 cells into the cell cycle." Cytometry **17**(1): 66-74.

Bourhis, J. (2005). "New approaches to enhance chemotherapy in SCCHN." Ann Oncol **16 Suppl 6**: vi20-vi24.

Choong, N. W. and E. E. Cohen (2006). "Epidermal growth factor receptor directed therapy in head and neck cancer." Crit Rev Oncol Hematol **57**(1): 25-43.

Clark, S. S., S. M. Perman, et al. (2002). "Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl-transformed cells is to induce growth arrest." Leukemia **16**(2): 213-22.

Dassonville, O., J. L. Formento, et al. (1993). "Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer." J Clin Oncol **11**(10): 1873-8.

De Vita V. T., H. S., Rosenberg S. A. (2001). CANCER - Principles of Oncology, Lippincott Williams & Wilkins.

Denkert, C., A. Furstenberg, et al. (2003). "Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference." Oncogene **22**(54): 8653-61.

Devriendt, D. and J. Klastersky (1997). "New cytostatic agents for the treatment of head and neck cancer." Acta Otorhinolaryngol Belg **51**(2): 61-8.

Dhooge, I. J. and F. W. Albers (1994). "Multiple primary tumors in head and neck cancer: etiology and incidence." J Belge Radiol **77**(2): 55-9.

Emdin, S. O., R. Stenling, et al. (1987). "Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. A flow cytometric study with some methodologic aspects." Cancer

60(6): 1282-7.

Gerdes, J., M. H. Becker, et al. (1992). "Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues." J Pathol **168**(1): 85-6.

Gerdes, J., H. Lemke, et al. (1984). "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67." J Immunol **133**(4): 1710-5.

Gerdes, J., L. Li, et al. (1991). "Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67." Am J Pathol **138**(4): 867-73.

Grandis, J. R. and D. J. Tweardy (1993). "Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer." Cancer Res **53**(15): 3579-84.

Grau, J. J., A. Cuchi, et al. (1997). "Follow-up study in head and neck cancer: cure rate according to tumor location and stage." Oncology **54**(1): 38-42.

Haddad, R. I., L. J. Weinstein, et al. (2004). "A phase II clinical and pharmacodynamic study of E7070 in patients with metastatic, recurrent, or refractory squamous cell carcinoma of the head and neck: modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by a novel chloroindolyl sulfonamide cell cycle inhibitor." Clin Cancer Res **10**(14): 4680-7.

Hashimoto, T., Z. He, et al. (2004). "Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells." Cancer Res **64**(9): 3344-9.

Herbst, R. S., M. Arquette, et al. (2005). "Phase II multicenter study of the epidermal growth factor receptor antibody cetuximab and cisplatin for recurrent and refractory squamous cell carcinoma of the head and neck." J Clin Oncol **23**(24): 5578-87.

Hortobagyi, G. N. (1999). "Recent progress in the clinical development of docetaxel (Taxotere)." Semin Oncol **26**(3 Suppl 9): 32-6.

Houck, J. R. and J. E. Medina (1995). "Management of cervical lymph nodes in squamous carcinomas of the head and neck." Semin Surg Oncol **11**(3): 228-39.

Hudis, C. A. (1999). "The current state of adjuvant therapy for breast cancer: focus on paclitaxel." Semin Oncol **26**(1 Suppl 2): 1-5.

Hussey, D. H., H. B. Latourette, et al. (1991). "Head and neck cancer: an analysis of the incidence, patterns of treatment, and survival at the University of Iowa." Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl **152**: 2-16.

Janinis, J., M. Papadakou, et al. (2000). "Combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in previously treated patients with advanced/recurrent head and neck cancer: a phase II feasibility study." Am J Clin Oncol **23**(2): 128-31.

Jedema, I., R. M. Barge, et al. (2004). "Acute myeloid leukemia cells in G0 phase of the cell cycle that are unresponsive to conventional chemotherapy are sensitive to

treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/diphtheria toxin fusion proteins." Exp Hematol **32**(2): 188-94.

Jedema, I., R. M. Barge, et al. (2003). "Recruitment of leukemic cells from G0 phase of the cell cycle by interferons results in conversion of resistance to daunorubicin." Leukemia **17**(10): 2049-51.

Jemal, A., R. Siegel, et al. (2006). "Cancer statistics, 2006." CA Cancer J Clin **56**(2): 106-30.

Kamikubo, K. H., K. Ogata, et al. (2000). "Low proportion of G0-phase cells during induction chemotherapy correlates with subsequent remission in acute myeloid leukemia." Int J Hematol **71**(3): 249-55.

Koldovsky, P., I. Haas, et al. (1995). "Immunohistochemical examination of 11 cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas, their recurrences or metastases." Eur Arch Otorhinolaryngol **252**(6): 359-65.

Kuroki, J., M. Hirokawa, et al. (1996). "Cell-permeable ceramide inhibits the growth of B lymphoma Raji cells lacking TNF-alpha-receptors by inducing G0/G1 arrest but not apoptosis: a new model for dissecting cell-cycle arrest and apoptosis." Leukemia **10**(12): 1950-8.

Lang, S., B. Wollenberg, et al. (2002). "[Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck]." Laryngorhinootologie **81**(7): 499-508.

Leemans, C. R., R. Tiwari, et al. (1993). "Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma." Cancer **71**(2): 452-6.

Liu, J. D., Y. J. Wang, et al. (2003). "Molecular mechanisms of G0/G1 cell-cycle arrest and apoptosis induced by terfenadine in human cancer cells." Mol Carcinog **37**(1): 39-50.

Löffler G., P. P. E. (1998). Biochemie und Pathobiochemie, Springer Verlag.

Luck, H. J., C. Thomssen, et al. (1997). "Phase II study of paclitaxel and epirubicin as first-line therapy in patients with metastatic breast cancer." Semin Oncol **24**(5 Suppl 17): S17-35-S17-39.

Lüllmann H., M. K., Wehling M. (2003). Pharmakologie und Toxikologie, Thieme Verlag.

Mamot, C., D. C. Drummond, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo." Cancer Res **65**(24): 11631-8.

Mamot, C., R. Ritschard, et al. (2006). "EGFR-targeted immunoliposomes derived from the monoclonal antibody EMD72000 mediate specific and efficient drug delivery to a variety of colorectal cancer cells." J Drug Target **14**(4): 215-23.

McLemore, M. L., S. Grewal, et al. (2001). "STAT-3 activation is required for normal G-CSF-dependent proliferation and granulocytic differentiation." Immunity **14**(2): 193-

204.

Mullen, P., W. N. Scott, et al. (1991). "Growth inhibition observed following administration of an LHRH agonist to a clonal variant of the MCF-7 breast cancer cell line is accompanied by an accumulation of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle." Br J Cancer **63**(6): 930-2.

Parker, S. L., T. Tong, et al. (1996). "Cancer statistics, 1996." CA Cancer J Clin **46**(1): 5-27.

Polek, T. C., L. V. Stewart, et al. (2003). "p53 Is required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced G0 arrest but is not required for G1 accumulation or apoptosis of LNCaP prostate cancer cells." Endocrinology **144**(1): 50-60.

Posner, M. R. (2001). "Docetaxel in squamous cell cancer of the head and neck." Anticancer Drugs **12 Suppl 1**: S21-4.

Posner, M. R., B. Glisson, et al. (2001). "Multicenter phase I-II trial of docetaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy for patients with locally advanced squamous cell cancer of the head and neck." J Clin Oncol **19**(4): 1096-104.

Posner, M. R., R. I. Haddad, et al. (2004). "Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: evolution of the sequential treatment approach." Semin Oncol **31**(6): 778-85.

Qian, X., W. C. Vass, et al. (1998). "N terminus of Sos1 Ras exchange factor: critical roles for the Dbl and pleckstrin homology domains." Mol Cell Biol **18**(2): 771-8.

Radbruch, A. (2000). Flow Cytometry and Cell Sorting, Springer Verlag.

Remmert, S., M. Rottmann, et al. (2001). "[Lymph node metastasis in head-neck tumors]." Laryngorhinootologie **80**(1): 27-35.

Riede U.-N., K. G., et al. (1998). Taschenatlas der allgemeinen Pathologie, Thieme Verlag.

Robbins, K. T., G. Clayman, et al. (2002). "Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **128**(7): 751-8.

Rubin Grandis, J., M. F. Melhem, et al. (1998). "Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival." J Natl Cancer Inst **90**(11): 824-32.

Russo, P., C. Ottoboni, et al. (2001). "RPR-115135, a new non peptidomimetic farnesyltransferase inhibitor, induces G0/G1 arrest only in serum starved cells." Int J Oncol **18**(4): 855-62.

Schoffski, P., J. Wanders, et al. (2000). "Docetaxel and cisplatin in head and neck cancer." Ann Oncol **11**(12): 1617.

Schoffski, P., T. Wehkopf, et al. (1998). "Advanced head and neck cancer and clini-

- cal experience of an effective new agent: docetaxel." Anticancer Res **18**(6B): 4751-6.
- Schrijvers, D. and J. B. Vermorken (1998). "Update on the taxoids and other new agents in head and neck cancer therapy." Curr Opin Oncol **10**(3): 233-41.
- Shah, J. P., A. R. Shaha, et al. (1976). "Carcinoma of the hypopharynx." Am J Surg **132**(4): 439-43.
- Shapiro, H. M. (2003). Practical Flow Cytometry, Hoboken, NJ : Wiley.
- Sisk, E. A., C. R. Bradford, et al. (2003). "Epstein-Barr virus detected in a head and neck squamous cell carcinoma cell line derived from an immunocompromised patient." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(10): 1115-24.
- Song, J. I. and J. R. Grandis (2000). "STAT signaling in head and neck cancer." Oncogene **19**(21): 2489-95.
- Vokes, E. E., R. R. Weichselbaum, et al. (1993). "Head and neck cancer." N Engl J Med **328**(3): 184-94.
- Wang, S. W., S. L. Pan, et al. (2005). "YC-1 [3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole] exhibits a novel antiproliferative effect and arrests the cell cycle in G0-G1 in human hepatocellular carcinoma cells." J Pharmacol Exp Ther **312**(3): 917-25.
- Wells, A. (1999). "EGF receptor." Int J Biochem Cell Biol **31**(6): 637-43.

## 8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben. Mir haben die Bearbeitung meines Dissertationsthemas und die Erstellung dieser Arbeit auch dank der freundlichen Unterstützung und der großen Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurden sehr viel Freude gemacht.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. med. Rainald Knecht, leitender Oberarzt der Hals- Nasen- und Ohrenklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, für die Möglichkeit, im von ihm geleiteten onkologischen Forschungslabor arbeiten zu dürfen. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen haben sicher zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Privatdozent Dr. med. Markus Hambek, Oberarzt der Hals- Nasen- und Ohrenklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, für die Bereitstellung des überaus interessanten Dissertationsthemas. Durch die Vergabe dieses Themas wurde ich das erste Mal an die interessanten Fragestellungen der onkologischen, speziell die der molekularbiologischen Forschung herangeführt. Besonders möchte ich ihm für die kompetente und intensive wissenschaftliche Betreuung, den regelmäßigen gedanklichen Austausch und die permanente persönliche und herzliche Unterstützung und konkrete Hilfestellung bei Fragen danken. Auch für die intensive Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Den Mitarbeitern des onkologischen Labors, besonders Frau Erika Weith möchte ich herzlich für die freundliche und überaus lebenswerte Art danken, mit der ich in das bestehende Laborteam aufgenommen wurde. Des Weiteren möchte ich mich bei ihr für die Geduld und den Einsatz bedanken, mit der sie mir die Arbeit in einem Labor nahe brachte und mich bei der Zellbearbeitung, dem Mikroskopieren und der Datengewinnung unterstützte. Ich habe sehr gerne in diesem Labor gearbeitet und bin froh durch diese Zeit fachlich, aber besonders auch menschlich sehr positive und angenehme Erfahrungen gemacht zu haben.

Meiner Freundin Isabelle und meiner Familie möchte ich für ihre Geduld und Nach-



sicht danken, die sie in der Zeit der Niederschrift der Arbeit mit mir hatten. Ich habe leider nicht immer die Zeit für sie haben können, die ich gerne gehabt hätte.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Christian Werner  
geboren am 30.10.1977 in Frankfurt am Main

### Schulbildung und Zivildienst

1984 – 1988 Ludwig-Richter-Schule, Grundschule, Frankfurt am Main  
1988 – 1997 Julius Ziehen Schule, Gymnasium, Frankfurt am Main  
1997 – 1998 Zivildienst, Pflegedienst, Hals-, Nasen- und Ohrenklinik des St. Marienkrankenhauses, Frankfurt am Main

### Berufliche Tätigkeit

1998 – 1999 Flugbegleiter, Deutsche Lufthansa AG

### Hochschulbildung

1999 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
2001 ärztliche Vorprüfung  
2002 1. Staatsexamen  
2005 2. Staatsexamen  
2006 3. Staatsexamen

**Famulaturen**

- 03/2002 **Innere Medizin**, Krankenhaus Barmherzige Brüder, Graz,  
Österreich
- 03/2003 **Allgemeinmedizin**, Gemeinschaftspraxis Dr. med. G. Schwarz,  
Garmisch-Partenkirchen
- 08/2003 **Gynäkologie und Geburtshilfe**, Bürgerhospital,  
Frankfurt am Main
- 03/2004 **Neurologie**, Städtische Kliniken Höchst, Frankfurt am Main

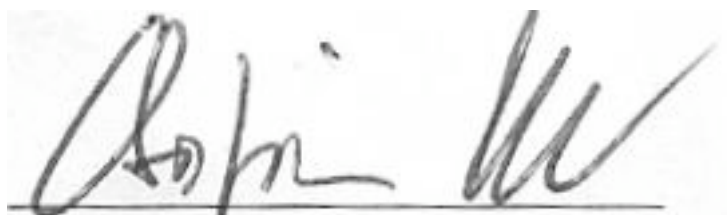
**Praktisches Jahr**

- 04/2005 – 08/2005 **Chirurgie**, Universitätsklinikum Frankfurt am Main
- 08/2005 – 12/2005 **Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde**, Universitätsspital Zürich,  
Zürich, Schweiz
- 12/2005 – 03/2006 **Innere Medizin**, Universitätsspital Basel, Basel, Schweiz

**Ärztliche Tätigkeit**

- seit 07/2006 Assistenzarzt an der **Klinik für Hals-, Nasen-,  
Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie** des  
Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Frankfurt, den 21.07.2007



## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**„Zellzyklussynchronisation humaner Plattenepithelkarzinomzellen mit Serotonin und EGF – Versuch der Überführung inaktiver G0-Phase-Zellen in eine proliferative Phase des Zellzyklus“**

im Zentrum der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

unter Leitung von Professor Dr. med. Rainald Knecht

mit Unterstützung durch Privatdozent Dr. med. Markus Hambek

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

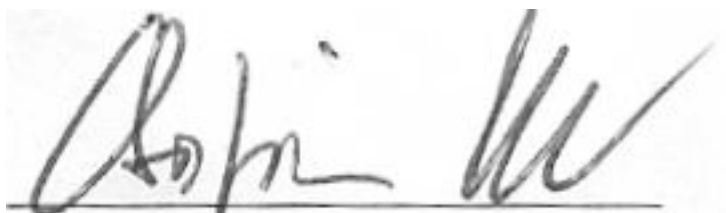
Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan

European Journal of Cancer, **Vol. 43/10**, pp. 1502-1507, 2007

Anticancer Research **26 2A**: 1091-1095, 2006

veröffentlicht.

Frankfurt, den 21.07.2007

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rainald Knecht', written over a horizontal line.